SPONTANE UND UV-INDUZIERTE MUTABILITÄT VON DREI UV-SENSIBLEN SACCHAROMYCES-MUTANTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG
DER DOKTORWÜRDE
DEM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
FRIEDERIKE ECKARDT
AUS CHEMNITZ

1974

SPONTANE UND UV-INDUZIERTE MUTABILITÄT VON DREI UV-SENSIBLEN SACCHAROMYCES-MUTANTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG
DER DOKTORWÜRDE
DEM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
FRIEDERIKE ECKARDT
AUS CHEMNITZ

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. W. Laskowski

2. Referent: Ass. Prof. Dr. U. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 2. 1974

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Kurze Übersicht über Reparaturprozesse	2
1.2	Modellvorstellungen über die UV-induzierte Mutagenese	8
1.3	Problemstellung	10
2.	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Saccharomyces-Stämme	12
2.1.1	Charakterisierung der Stämme	12
2.1.2	Aufbewahrung	14
2.2	Medien	14
2.3	Strahlenquellen und Bestrahlungsbedingungen	16
2.3.1	Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV)	16
2.3.2	Photoreaktivierung	16
2.4	Ultraschallbehandlung	17
2.5	Genetische Analysen	19
2.5.1	Kreuzung von Haplonten	19
2.5.2	Sporulation	19
2.5.3	Paarungstyp-Bestimmung	20
2.5.4	Bestimmung der Atmungsfähigkeit	20
2.5.5	Schnelltests zur Bestimmung der Strahlensensibilität	21
2.5.6	Unterscheidung von Locus- und Suppressormutanten	22
2.6	Bestimmung der UV-induzierten Mutationsrate	23
2.6.1	Prinzip des Rückmutations-Tests	23
2.6.2	Rechnerischer Ansatz	24

Seite

4.1.2 Isogenität der rad Stämme 100

4.1.3 Verschiedene Modelle zur Erklärung der Strahlen-Sensibilität der rad Stämme 102

4.2 Kontrollieren das R^s_1 und R^s_2 Gen einen Schritt des Excision Repair Systems? 106

4.3 Mutationsverhalten der rad Stämme 110

4.3.1 UV-Mutation von der Auxotrophie zur Prototrophie 110

4.3.2 Unterschiedlicher Einfluß der rad Gene auf die Locus- und Suppressormutation 113

4.3.3 Einfluß der rad Gene auf die spontane Mutation 122

4.3.4 Einfluß der rad Gene auf die Induktion von atmungsdefekten Mutanten 125

4.3.5 Schlußfolgerungen aus dem Mutationsverhalten der strahlensensiblen Mutanten 130

4.4 Kinetik der UV-induzierten Mutagenese 136

4.4.1 Methodisches zur Untersuchung der Mutationskinetik 136

4.4.2 Modellvorstellungen zur Erklärung der quadratischen Mutationskinetik 140

4.4.3 Induktion eines Reparatursystems bei Hefen? 150

5. ZUSAMMENFASSUNG 153

Literaturverzeichnis 157

3.4.3	Untersuchungen des Einflusses von Adenin-Substitution im Medium auf die ADE-Rate	60
3.5	Einfluß der Atmungsfähigkeit einer Population auf die Reparaturkapazität	63
3.5.1	Problemstellung	63
3.5.2	Experimentelle Ergebnisse	64
3.6	Photoreaktivierung von letalen und mutativen Schäden	75
3.6.1	Problemstellung	75
3.6.2	Methodisches	76
3.6.3	Experimentelle Ergebnisse	76
3.7	Einfluß der rad Gene auf die spontane Mutation	82
3.7.1	Vergleich der Zahl der prototrophen Mutanten in den unbestrahlten Kontrollen	83
3.7.2	Bestimmung der spontanen Rate zur ADENIN-Prototrophie mit Hilfe des Fluktuationstests	86
3.8	UV-Induktion von atmungsdefekten Mutanten	88
3.8.1	Methodisches zur Bestimmung der Mutationsraten zur Atmungsdefizienz	89
3.8.2	Experimentelle Ergebnisse	91
4.	DISKUSSION	94
4.1	Experimentell gesicherte und hypothetische Voraussetzungen für die Interpretation der Ergebnisse	95
4.1.1	Biologische Wirkung von UV-Photoprodukten in bestrahlten Zellen	96
4.1.1.1	UV-Photoprodukte bei in vitro Bestrahlung der DNS	97
4.1.1.2	Dosisabhängigkeit der Schadensinduktion	97
4.1.1.3	Reparierbarkeit der UV-Photoprodukte	99
4.1.1.4	Mutagenität der UV-Photoprodukte	99

Seite

4.1.2 Isogenität der rad Stämme 100

4.1.3 Verschiedene Modelle zur Erklärung der Strahlen-Sensibilität der rad Stämme 102

4.2 Kontrollieren das R^s_1 und R^s_2 Gen einen Schritt des Excision Repair Systems? 106

4.3 Mutationsverhalten der rad Stämme 110

4.3.1 UV-Mutation von der Auxotrophie zur Prototrophie 110

4.3.2 Unterschiedlicher Einfluß der rad Gene auf die Locus- und Suppressormutation 113

4.3.3 Einfluß der rad Gene auf die spontane Mutation 122

4.3.4 Einfluß der rad Gene auf die Induktion von atmungsdefekten Mutanten 125

4.3.5 Schlußfolgerungen aus dem Mutationsverhalten der strahlensensiblen Mutanten 130

4.4 Kinetik der UV-induzierten Mutagenese 136

4.4.1 Methodisches zur Untersuchung der Mutationskinetik 136

4.4.2 Modellvorstellungen zur Erklärung der quadratischen Mutationskinetik 140

4.4.3 Induktion eines Reparatursystems bei Hefen? 150

5. ZUSAMMENFASSUNG 153

Literaturverzeichnis 157

1. EINLEITUNG

Die Strahlenbiologie stellt ein wichtiges interfakultatives Gebiet dar, zu dessen Verständnis das Zusammenwirken von physikalischen, chemischen und biologischen Vorgängen erfaßt werden muß.

Interessant ist es, die Entwicklung strahlenbiologischer Modellvorstellung zu verfolgen: aus einem relativ starren, mechanistischem Schema, das durch Denkmodelle der Chemie und Physik geprägt war, haben sich Vorstellungen über in hohem Maße dynamische Abläufe der Zelle entwickelt.

Man kann diese Entwicklung in vier Phasen gliedern:

1. Treffer- und Treffbereich-Theorie:
   Ein rein mechanistisches Modell versucht, die Sensibilität der Organismen mit Hilfe statistischer Überlegungen über die Wechselwirkung von Treffern (Energiequanten) mit Treffbereichen (sensible Bereiche der Zelle, deren chemische Veränderung aufgrund der Energieabsorption zu biologischer Funktionsunfähigkeit führt) zu erklären.

2. Reparatur-Modelle
   Einsichten in den Zusammenhang von Sensibilität und physiologischen Bedingungen führen zur Einbeziehung des biologischen Systems Zelle als reagierender Partner.
   Die Isolierung von strahlensensiblen Mutanten führt zu der Kenntnis von genetisch fixierten, enzymatischen Reparaturprozessen an geschädigter DNS.

3. Gültigkeit der Reparatur-Modelle für "zellintern" erzeugte Schäden. Man erkennt die Beteiligung der Reparaturprozesse

an allen Vorgängen der DNS, die nicht ohne zeitlich und örtlich begrenzte Veränderung von deren Struktur erfolgen: Mutation, Rekombination, Replikation und Transkription.

4. Reparaturprozesse als Regelsystem
   Die Frage nach der Koordinierung der verschiedenen Reparaturprozesse untereinander und mit verschiedenen Stoffwechselprozessen führt zu der Erkenntnis einer höchst dynamischen Reaktionsfähigkeit der Zelle auf verschiedene innere und äußere schädigende Einflüsse, die den Bestand der Zelle gefährden.

Die strahlenbiologische Forschung befindet sich heute in der vierten Phase. Sie versucht, das zahlreiche Faktenmaterial derart zu ordnen und zu ergänzen, daß die Wechselbeziehung der Reparatursysteme mit dem Stoffwechselgefüge der Zelle transparent werden. Anwendung finden diese Erkenntnisse in der Strahlentherapie.

1.1 Kurze Übersicht über Reparaturprozesse

Vom Prinzip her lassen sich drei verschiedene Arten der Reparatur denken:

1. Umkehr der chemischen Reaktion, die zur Bildung des Schadens geführt hat.
2. Entfernung des Schadens aus dem einen DNS-Strang und Ersatz durch Neusynthese mit Hilfe des intakten Stranges als Matrize.
3. Umgehung des Schadens bei der Replikation und Reparatur des bei der Replikation entstandenen Sekundärschadens.

Tatsächlich sind diese drei Prinzipien auch in drei verschiedenen Reparatursystemen in der Bakterienzelle realisiert. Da es eine große Zahl an zusammenfassenden Arbeiten über die Reparaturprozesse der Bakterienzelle gibt, soll im folgenden nur das Prinzip der Prozesse dargestellt werden.

- Photoreaktivierung (PhR) arbeitet nach Prinzip 1

  Dieser Prozeß ist nur auf einen Schadenstyp, die durch UV-Bestrahlung erzeugten Pyrimidindimere, spezialisiert und erfordert nur ein Enzym.
  Das PhR-Enzym spaltet unter Absorption von Licht ($\lambda \geq$ 300 nm) das Pyrimidindimer in die monomeren Pyrimidine, d.h. die Bildungsreaktion wird auf enzymatischem Wege umgekehrt.
  Eine phr^- Mutante ist bekannt.
  (reviews: SETLOW 1966a, b, SCHUSTER 1969, HARM et al. 1971)

- Excision Repair (EXC-System) arbeitet nach Prinzip 2

  Dieser Prozeß beseitigt neben Pyrimidindimeren auch andere Schäden unterschiedlicher Herkunft.
  Er ist energieabhängig, bezieht jedoch seinen Energiebedarf aus dem Energiestoffwechsel der Zelle (" Dunkelreparatur").

  Der Prozeß ist durch folgende Arbeitsschritte gekennzeichnet:
  - Einschnitt neben der Schadensstelle ("incision") durch eine Endonuklease-Funktion
  - Entfernung des Schadens samt benachbarter Nukleotide ("excision") durch eine Exonuklease-Funktion
  - Reparatursynthese ("repair replication") zum Ersatz der ausgeschnittenen Nukleotide mit Hilfe des komplementären Stranges als Matrize durch eine Polymerase-Funktion
  - Verknüpfung des neusynthetisierten DNS-Stranges mit dem alten ("rejoining") durch eine Ligase-Funktion

  Obwohl das Ausschneiden der Dimere als auch die Reparatursynthese biochemisch nachgewiesen und damit das Prinzip des EXC-Systems bestätigt wurde, ist selbst bei E.coli eine Erfassung aller beteiligten Enzyme bzw. ein Modell ihrer Zusammenarbeit noch nicht gelungen. Diese Schwierigkeit ist wohl dadurch

begründet, daß einerseits ein Enzym mehrere Funktionen übernehmen, andererseits eine Funktion von mehreren Enzymen ausgeführt werden kann.
Als Mutanten, die in einem Schritt des EXC-Systems defekt sind, sind bei E. coli die uvr^- (A bis E) und pol^- (A bis C) Mutanten bekannt.

- Recombination Repair (REC-System) arbeitet nach Prinzip 3

Auch dieses System beseitigt neben Pyrimidindimeren andere Schäden unterschiedlicher Herkunft und ist ebenfalls lichtunabhängig.

Der Prozeß ist durch folgendes charakterisiert:

- Die DNS-Polymerase wird durch einen Schaden in einem Strang in der Replikation nicht völlig gestoppt, sondern in ihrer Arbeitsweise verändert.
- An der Schadensstelle fehlt die Information für den neu zu synthetisierenden Strang, es bleibt an dieser Stelle eine Lücke ("gap").
  Der komplementäre Schwesterstrang wird normal repliziert, so daß die Information der betreffenden Stelle in einer exakten Kopie vorliegt.
- Die Stranglücke in dem neusynthetisierten Strang wird durch einen Rekombinationsvorgang mit der intakten Schwester-DNS-Helix geschlossen.
- In der Schwester-DNS auftretende Lücken oder Brüche können repariert werden, da ein Strang mit intakter Information zur Verfügung steht.

Auch bei diesem Reparatursystem sind durch biochemische Methoden die Entstehung der "gaps" bei der Replikation als auch deren Schließung durch den Austausch von Stranglücken nachgewiesen worden. Es besteht auch kein Zweifel darüber, daß die

Reparatur an einen Rekombinationsvorgang geknüpft ist, da reparaturdefekte Mutanten gleichzeitig immer eine völlige oder teilweise Unfähigkeit zur Rekombination zeigen. Jedoch sind die Arbeitsschritte und die sie kontrollierenden Gene nicht im Detail bekannt.
Die rec^- (A bis C) und exr^- Mutanten bei E.coli sind in einem Schritt des REC-Systems defekt.
(reviews für beide Reparatursysteme : HOWARD-FLANDERS 1968a,b, HAYNES et al. 1968, SMITH und HANAWALT 1969, KÖSSLER 1970, SMITH 1971, BEERS et al. 1972).

Reparatursysteme bei Saccharomyces

Während die Photoreaktivierung mit großer Wahrscheinlichkeit abläuft wie bei Bakterien (in vitro Versuche zum Mechanismus der PhR wurden mit dem aus Hefe isolierten PhR-Enzym durchgeführt), scheinen die lichtunabhängigen Reparaturvorgänge bei Saccharomyces noch komplizierter als bei Bakterien zu sein.

Darauf weist die große Zahl an strahlensensiblen Mutanten (Übersicht bei AVERBECK 1970), die durch Komplementations- und Rekombinationsversuche der Mutation von 22 rad Genen (d.h. Strahlensensibilität [radiation sensitivity] verursachenden Genen) zugeordnet werden konnten (GAME und COX 1971). Durch einige inzwischen isolierte und noch nicht klassifizierte strahlensensible Mutanten ist mit einer noch höheren Zahl an rad Genen zu rechnen.
Es ist schwierig, eine so große Zahl an Genen wenigen Reparatursystemen zuzuordnen, zumal zu vermuten ist, daß nicht alle Gene Strukturgene von Reparaturenzymen darstellen.

Sicher ist, daß auch in Hefen Excision Repair stattfindet. In Analogie zu dem Verhalten entsprechender Bakterienmutanten konnte dies bei einer großen Zahl an sensiblen Hefemutanten aus dem biologischen Verhalten, inzwischen auch durch biochemische Untersuchungen (UNRAU et al. 1972, RESNICK und SETLOW 1972) bewiesen werden. GAME und COX (1972) haben Argumente dafür, daß mindestens die rad Gene 1 bis 4 das EXC-System kontrollieren. Man kann annehmen, daß noch mehr Gene an der Kontrolle beteiligt sind, wenn bereits bei Escherichia coli acht das EXC-System kontrollierende Gene bekannt sind.

Über ein dem REC-System entsprechendes Reparatursystem bei Hefen besteht bis heute noch keine Klarheit. Es gibt Anzeichen dafür, daß die Funktionen des REC-Systems der Bakterien bei Hefen nicht von einem einzigen Enzymsystem durchgeführt werden.

RODARTE-RAMON (1972a,b) isolierte 10 rec^- Mutanten von Saccharomyces, die eine reduzierte mitotische und z.T. auch reduzierte meiotische intragenische Rekombination zeigen. Die Mutanten sind nicht in der mitotischen und meiotischen intergenischen Rekombination gestört und nur einige von ihnen sind strahlensensibel. Das bedeutet offenbar, daß in Hefen

- für intergenische und intragenische Rekombiantion unterschiedliche Enzymwege nötig sind,
- für mitotische und meiotische intragenische Rekombination gemeinsame Enzymschritte möglich sind,
- die Kopplung von Rekombiantions- und Reparaturvorgang nicht in dem Maße existiert wie in Bakterien.
  Bereits in Untersuchungen von SNOW (1967), MOUSTACCHI (1969) und ZAKHAROV et al. (1970) hatte sich ergeben, daß meiotische Rekombination und Reparatur offenbar keine gemeinsamen Enzymwege haben. Dagegen existieren gemeinsame Schritte für mitotische Rekombination und Reparatur.

- Außerdem gibt es Beweise dafür, daß Mutationsereignisse in Hefen nicht an Rekombinationsereignisse gebunden sind (LEMONTT 1970, 1971a, b).

Auch der unterschiedliche Einfluß von Liquid Holding (Aufbewahrung der bestrahlten Zellen ohne Nährstoff in Puffer) und PhR nach Bestrahlung auf die intra- und intergenische Rekombination bei dem resistenten Wildtyp und verschiedenen strahlensensiblen Mutanten läßt den Schluß zu, daß intragenische und intergenische Rekombination durch verschiedene Reparaturschritte beeinflußt werden. (PARRY und COX 1968, PARRY und PARRY 1972, HUNNABLE und COX 1971). Es wird vermutet, daß intragenische Rekombination ohne vorherige Replikation ablaufen kann ("dark recombination"), jedoch kann auch ein an die DNS-Replikation anschließender Prozeß intragenische Rekombination erzeugen. Die Wege, die zu intergenischer Rekombination führen, bleiben unklar.

Die aus dem unterschiedlichen Verhalten der rad Mutanten postulierte genetische Steuerung dieser Prozesse (HUNNABLE und COX 1971) ist äußerst hypothetisch und nicht durch genetische Analysen unterstützt.
Auch die Untersuchungen, die an verschiedenen Doppelmutanten gemacht wurden (AVERBECK 1970, KHAN et al. 1970, GAME und COX 1972) können nicht zur Klärung beitragen, da bei ihnen vorwiegend der Einfluß von Röntgensensibilität verursachenden Genen auf die Sensibilität excision-defekter Mutanten untersucht wurden. Es ist daher nicht auszusagen, ob die durch genetische Analyse vermuteten Reparatursysteme mit den aus strahlenbiologischen Versuchen postulierten übereinstimmen.

Es sollte erwähnt werden, daß bei Ustilago (HOLLIDAY 1971) der biochemische Beweis erbracht werden konnte, daß eine an mitotische Rekombination geknüpfte Reparatur vor der DNS-Replikation erfolgen kann.

1.2 Modellvorstellungen über die UV-induzierte Mutagenese

Obwohl der molekulare Ablauf der Mutagenese in allen Einzelheiten noch nicht verstanden ist, gibt es einige Beweise dafür, daß mutative Informationsänderungen an der DNS nicht durch völlig zufällige Irrtümer, sondern unter genetischer Kontrolle stehen. Dafür gibt es folgende Argumente:

- Durch UV-Bestrahlung treten bei Bakteriophagen, Bakterien und Pilzen bevorzugt Additions-Deletions-Mutanten (AD-DEL) und G:C → A:T - Transitionen, kaum A:T → G:C-Transitionen und noch weniger Transversionen und größere Deletionen auf (DRAKE 1969b). Das gilt auch dann,wenn durch UV-Bestrahlung unter Acetophenon-Sensibilisierung fast ausschließlich Thymindimere entstehen (MEISTRICH und DRAKE 1972).

- Durch die Mutation eines Enzyms, z.B. einer Polymerase, kann diese Mutationstyp-Spezifität spezifisch verändert werden, so daß z.B. wesentlich mehr Transversionen auftreten (DRAKE 1973).

- Der Mutationsprozeß ist an enzymatische Reparaturvorgänge und an ein die Fehlerhaftigkeit kontrollierendes Gen gebunden.

Da über die UV-induzierte Mutagenese bei E.coli eine Anzahl guter Übersichtsartikel vorhanden sind (BRIDGES 1969, WITKIN 1966a,b, 1967, 1969, WITKIN und GEORGE 1973) soll nur das Prinzip des Mutationsvorganges ohne experimentelle Details dargestellt werden:
Bei Bakterien gilt, daß mit ziemlich hoher Wahrscheinlichkeit PhR völlig und das EXC-System weitgehend fehlerfrei arbeiten und daß das REC-System der eigentlich fehlerhafte Prozeß ist.
Ein UV-induziertes Mutationsereignis kann nur in Verbindung mit einem Rekombinationsereignis auftreten (recA$^-$ Mutanten von E.coli zeigen keinerlei UV-induzierte Rekombination und Mutation) und auch

nur in Anwesenheit des EXR-Genproduktes, das offenbar die Fehlerhaftigkeit des Rekombinationsvorganges kontrolliert; über den Mechanismus dieser Kontrolle bestehen nur Hypothesen.

Der fehlerhafte Rekombinationsprozeß findet vorwiegend an den gaps der Tochter-DNS nach Replikation statt, d.h. er wird ausgelöst durch die vom EXC-System nicht beseitigten UV-Schäden. In wesentlich selteneren Fällen scheint es möglich zu sein, daß ein fehlerhafter Rekombinationsvorgang auch an den excision gaps stattfindet, d.h. ausgelöst wird durch einen ausgeschnittenen Schaden.

Der molekulare Ablauf eines Mutationsvorganges ist im Detail nicht bekannt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß verschiedene, evtl. Schadenstyp- oder Mutationstyp-spezifische Mutationsmechanismen existieren.

Für Saccharomyces ist der Mutationsmechanismus noch weniger geklärt, nicht zuletzt wegen der Unsicherheit über die Reparatursysteme, die außer dem EXC-System arbeiten. (Eine Übersicht über das generell recht unerforschte Gebiet der Mutagenese bei Eukaryonten geben AUERBACH und KILBEY 1971).

Übereinstimmung mit Bakterien besteht darin, daß PhR und das EXC-System mit sehr geringer Fehlerhaftigkeit arbeiten (RESNICK 1968). Nach Untersuchungen von LEMONTT (1970, 1971 a-c, 1972) ist in Hefen das REV-System an der Entstehung der mutativen Informationsänderungen von UV-Schäden ausgelöst, beteiligt. Die drei bisher identifizierten rev^- Gene verursachen mittlere UV-Sensibilität und unterschiedlich starke Reduktion der UV-induzierten Reversion zur Prototrophie bzw. Induktion zur Auxotrophie. Die REV Gene sind nicht im EXC-System einzuordnen.

LEMONTT vermutet, daß die von dem EXC-System nicht entfernten Schäden bei der Replikation Sekundärschäden verursachen, die durch

die REV-Reparatur z.T. fehlerhaft repariert werden. Im Unterschied zu dem REC-System der Bakterien ist dafür kein Rekombinationsereignis nötig.

In rev/rev Diplonten ist die UV-induzierte mitotische intra- und intergenische Rekombinationsrate höher als im Wildtyp, ein Einfluß auf die spontane meiotische intra- und intergenische Rekombination kann nicht festgestellt werden.

Über den molekularen Mechanismus der REV-Reparatur ist nichts bekannt.

Es ist fraglich, ob die REV Gene die einzigen Gene sind, die an der induzierten Mutagenese von Hefen beteiligt sind, denn es gibt widersprüchliche Ergebnisse. Z.B. verursachen einige der rev Allele eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Häufigkeit an Suppressormutationen, und es gibt auch Belege dafür, daß die spontane Mutation vom AD-DEL-Typ mit meiotischen Rekombinationsvorgängen verknüpft ist (MAGNI 1962, MAGNI und SORA 1969). So ist es nicht ausgeschlossen, daß auch bei Hefen mehrere enzymatische Wege existieren, die mutative Veränderungen der DNS verursachen.
Untersuchungen über weitere in der UV-Mutagenese defekte Mutan- sind im Gang (LEMONTT 1973).

1.3 Problemstellung

Die Untersuchung des Mutationsverhaltens der strahlensensiblen Mutanten r^s_1, r^s_2 und rad2 und des -resistenten Wildtyps erfolgte aufgrund der Wechselbeziehung von Mutation und Reparatur unter zwei Aspekten:

1. Untersuchung der Reparaturvorgänge durch das Mittel der Mutation.
   Der Grundgedanke dabei ist, daß die Reparatur letaler Schäden

durch die Untersuchung des Koloniebildungsvermögens von Zellen nur indirekt erfaßt werden kann. Im Zeitpunkt der Untersuchung der Nachkommen der überlebenden Zellen kann nicht mehr festgestellt werden, ob die teilungsfähige "Ahn-Zelle" letale Schäden erhalten hatte, bzw. wenn sie letale Schäden hatte, wo diese lokalisiert waren und wie sie diese bewältigte.

Bei der Mutation läßt sich durch geeignete Systeme auch viele Generationen nach dem eigentlichen Ereignis dessen Ort bestimmen und die Art der Veränderung. Die mutative Informationsveränderung wird für einen Reparaturvorgang zum Indiz, aus dem Rückschlüsse über den Vorgang möglich werden.

2. Untersuchung der Mutagenese durch Ausschluß unterschiedlicher Reparaturprozesse
Wenn Mutanten, die in einem bestimmten Reparaturschritt defekt sind, eine qualitativ und/oder quantitativ veränderte UV-Mutabilität zeigen, ist ein Rückschluß auf die Beteiligung dieses Reparaturprozesses an den Vorgängen möglich, die zu einer mutativen Informationsänderung der DNS führen, d.h. also über die Mutagenese im Wildtyp.

Konkret formuliert, lautete die Fragestellung:

- Beruht die Strahlensensibilität der Mutanten tatsächlich auf dem Defekt eines Reparaturenzyms, das Schäden aus der DNS entfernt?
- Läßt das Mutationsverhalten der Stämme einen Schluß zu, in welches Reparatursystem das R_1^s und R_2^s Gen einzuordnen sind?
- Gibt es Hinweise darauf, welche Enzymfunktion (en) durch das R_1^s bzw. R_2^s Gen kontrolliert werden?
- Lassen sich aus dem Mutationsverhalten der Stämme Hinweise auf den Ablauf der UV-induzierten Mutagenese, insbesondere über die Arbeit des REV-Systems finden?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Saccharomyces-Stämme

Tabelle 1 Genetische Eigenschaften der verwendeten Haplonten

Stammbezeichnung	PT	Strahlensensibilität	Bedürftigkeit
235-11c	a	+	ade2 lys2 his3 ura1
2110-222	a	r^s_1	ade2 lys2 his3 ura1
2110-23	α	r^s_1	ade2 lys2 his3 URA
2121-140	α	r^s_2	ade2 lys2 his3 ura1
2104-56	a	r^s_{3-1} (rad2-19)	ade2 lys2 his3 ura1
2105-15	α	r^s_{3-2} (rad2-20)	ade2 lys2 his3 ura1
2105-178	a	r^s_{3-2} (rad2-20)	ade2 lys2 his3 URA

In der Tabelle wie auch im gesamten Text wird ein Gen in mutiertem Zustand durch kleine Buchstaben gekennzeichnet, also z.B. ura1 oder r^s_1, der entsprechende Wildtyp-Zustand durch große Buchstaben, z.B. URA oder R^s_1.

2.1.1 Charakterisierung der Stämme

In Tabelle 1 sind alle haploiden Hefestämme aufgeführt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.
Sie wurden alle von KOWALSKI (1971) durch Kreuzung des 235-11c mit den von AVERBECK und LASKOWSKI isolierten strahlensensiblen Hefestämmen (LASKOWSKI et al. 1968, AVERBECK et al. 1970)

hergestellt und sind weitgehend isogen.

Ursprünglich wurden die strahlensensiblen Gene als r^s Gene bezeichnet, sie sollten jedoch auf Beschluß der International Yeast Genetics Conference in Chalk River, Ontario, Canada, 1970, hin nach der standardisierten rad-Nomenklatur benannt werden. Die Identifizierung der r^s_3 Allele mit den rad2 Allelen (GAME und COX 1971) gelang, jedoch erbrachten Kreuzungen von Stämmen mit dem r^s_1 bzw. r^s_2 Gen mit Stämmen mit anderen rad Genen keine eindeutigen Ergebnisse, so daß diese beiden Gene noch nicht in dem rad-System eingeordnet werden konnten. Wenn im folgenden von "rad Stämmen" die Rede ist, sind jedoch auch diese beiden noch nicht klassifizierten Mutanten eingeschlossen.

Biochemische Untersuchungen von UNRAU et al. (1971) und RESNICK und SETLOW (1972) konnten sicherstellen, daß rad2 Stämme Endonuklease-defekt sind, und bestätigten damit alle Analogschlüsse auf uvr^- Mutanten von Bakterien, die aufgrund des ähnlichen strahlenbiologischen Verhaltens gezogen worden waren. Zu welchem Reparatursystem das R^s_1 und R^s_2 Gen gehören, ist unbekannt.

Die Loci ade2 und lys2 sind supersupprimierbar. Eine genetische Analyse wurde nicht durchgeführt, jedoch ist es nach einer persönlichen Mitteilung von LASKOWSKI sehr wahrscheinlich, daß es sich um die Allele ade2-1 und lys2-1 handelt, die durch ochre-Suppressoren der Klassen Ibis III (bzw. IV) supprimierbar sind (HAWTHORNE und MORTIMER 1968)
Bei den Loci his3 und ura1 ist nicht bekannt, auf welchen Mutationstyp diese Bedürftigkeiten zurückgehen, sie sind jedoch beide nicht zusammen mit ade2-1 und lys2-1 supprimierbar (ECKARDT 1970).

Für ade2 Mutanten ist eine rote Koloniefärbung typisch. Das ADE2 Gen enthält die Information zur Synthese von CAIR (5-Amino-4-imidazol-carbonsäure) in der Purinbiosynthese (FISHER 1969).

Eine Mutation in diesem Gen hat eine Anhäufung von AIR (5-Amino-imidazol-ribotid) zur Folge, das unter bestimmten Wachstumsbedingungen polykondensiert und ein rotgefärbtes Pigment bildet (Zusammenfassende Darstellung bei REICHERT 1968).

Eine allen Stämmen gemeinsame Eigenschaft ist die hohe spontane Mutationsrate zur Atmungsdefizienz, die u.a. möglicherweise durch die Adeninbedürftigkeit bedingt ist (MOUSTACCHI 1971). Während ein Anteil von 1 bis 5% bei Hefen als normal angesehen werden kann (KRAEPELIN 1967), liegt bei unseren Haplonten der Anteil bei ca. 50% Atmungsdefekten in einer Zellpopulation und läßt sich weder durch wiederholte Anzucht von einer atmungskompetenten Kolonie ausgehend, noch durch Vorkultur auf Spezialmedien wesentlich herabdrücken.
Atmungsdefekte Zellen bilden trotz des ade2 Gens weiß gefärbte Kolonien, so daß der Anteil von atmungsdefekten zu atmungskompetenten Zellen in einer Population leicht feststellbar ist.

2.1.2 Aufbewahrung

Alle Stämme werden auf Vollmedium-Schrägagarröhrchen bei $4^{o}C$ aufbewahrt. Um Degeneration zu vermeiden, werden sie alle 6 bis 8 Monate umgeimpft. Da sich die strahlensensiblen Stämme schnell in ihren genetischen Eigenschaften verändern, muß bei jedem Umimpfen eine Kontrolle der Bedürftigkeiten und der Strahlensensibilität durchgeführt werden.

2.2 Medien

a) Vollmedium (VM)

2 % Agar
2 % Glucose
1 % Yeast-Extract (DIFCO)
1 % Pepton (MERCK)

b) Glycerin-Medium (GM)

wie a), jedoch statt Glucose 2 % Glycerin

c) Glycerin-Medium+ Glucose (GM+G) [Nachweismedium für atmungsdefekte Stämme]

wie b), jedoch mit Zusatz von 0,02 % Glucose

d) Minimal-Medium (MM)

2 % Agar

2 % Glucose

0,67 % Yeast Nitrogen Base without amino acids (DIFCO)

sowie folgende Zusätze zur Kompensation der Bedürftigkeiten der Stämme

20 mg/l Adenin

10 mg/l Uracil

10 mg/l Histidin

50 mg/l Lysin

e) Mangel-Medien

wie d), jedoch unter Weglassung einer Aminosäure bzw. Nukleotidbase,

z.B. MM - Ade ist MM ohne Adenin

MM - Lys ist MM ohne Lysin

f) Präsporulationsmedium nach McClary (1959)

2 % Agar

2 % Glucose

0,2 % Ammoniumsulfat

0,2 % Kaliumhydrogensulfat

0,5 % Yeast-Extract (DIFCO)

Das Medium sollte 7 Tage vor Gebrauch gekocht werden.

g) Sporulationsmedium (nach McClary verändert)

2 % Agar

0,82 % Kalium-Acetat

0,1 % Glucose

0,25 % Yeast-Extract (DIFCO)

0,1864 % Kaliumchlorid

0,035 % Magnesiumsulfat

Für flüssige Medien entfällt der Agar-Zusatz.

Alle Medien werden mit entmineralisiertem Wasser zubereitet und im Autoklaven sterilisiert: Minimal- und Mangelmedien 25 min bei 115°C, alle anderen Medien bei 123°C 15 min lang.

Für die Gewinnung der Zellsuspension und die Verdünnungen wurde ein m/20 KH_2PO_4 Puffer benutzt (pH 4,8).

2.3 Strahlenquellen und Bestrahlungsbedingungen

2.3.1 Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV)

Zur UV-Bestrahlung diente eine Quecksilber-Niederdruck-Lampe HNS 12 (Osram), die vorwiegend Licht der Wellenlänge 254 nm abstrahlt. Die Dosisrate an der Oberfläche der bestrahlten Zellsuspension wurde bei einem Abstand von 42 cm zur Strahlenquelle mit einem Quantenflußmesser nach SCHAARSCHMIDT (1970) zu 4 erg $mm^{-2} s^{-1}$ bestimmt. Die Dosis wurde durch Variation der Bestrahlungszeit, nicht der Dosisleistung variiert. Während der Bestrahlung in offenen Petrischalen von 3 cm bzw. 4,5 cm Durchmesser wurde die Zellsuspension gerührt.

2.3.2 Photoreaktivierung

Die Photoreaktivierung wurde mit einer Leuchtstoffröhre (Osram L 20 W/70), deren Wellenlänge zwischen 350 nm und 560 nm liegt, in einem Abstand von 6 cm von der gerührten Suspension bei 30°C durchgeführt. Um inaktivierende Wellenlängen des nahen UV-

Bereichs wegzufiltern, befand sind zwischen Leuchtstoffröhre und Suspension eine Folie, MYLAR 500W/2 (DUPONT), die ab 390 nm durchlässig ist.

2.4 Ultraschallbehandlung

Da alle Stämme ziemlich stark klumpen, für die Versuche jedoch Einzelzellsuspensionen benötigt werden, wurde zur Reduzierung der Zellklumpen eine Ultraschallbehandlung durchgeführt. Benutzt wurde der BRANSON-Ultraschall-Desintegrator (Sonifer S 75) bei einer Arbeitsfrequenz von 20 kHz und einer mittleren Schalleistung von 75 W, in der Intensitätsstellung 4 und bei einer Resonanz bei 3,6 bis 3,8 Ampère.
6 ml Zellsuspension wurde in einem 10 ml fassenden Zentrifugenglas unter Eiskühlung beschallt, um eine Abtötung der Zellen durch Hitzeentwicklung bei der Beschallung zu verhindern.

JANNSEN und LASKOWSKI (1967) hatten an einem haploiden Hefestamm (211-1b), der hinsichtlich der Strahlensensibilität Wildtyp-Verhalten zeigt, nachgewiesen, daß unter den angegebenen Bedingungen 1 min Ultraschall-Behandlung noch keine Inaktivierung des Zellteilungsvermögens bewirkt und auch im Gegensatz zu höherploiden Stämmen keine Hemmung von Atmungs- und Gärungsfähigkeit. Da die Möglichkeit bestand, daß die strahlensensiblen Stämme wesentlich empfindlicher auf Ultraschallbehandlung reagieren, wurde neben der Wirksamkeit in der Klumpenzerstörung die Beeinflussung der Koloniebildung und der Anteil an atmungsdefekten Zellen der Zellpopulation nach verschiedenen Beschallungszeiten untersucht.

Aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß bei dem hochsensiblen Stamm 2105-15 (rad2-20) durchaus eine Reduzierung der Teilungsfähigkeit und-wenn

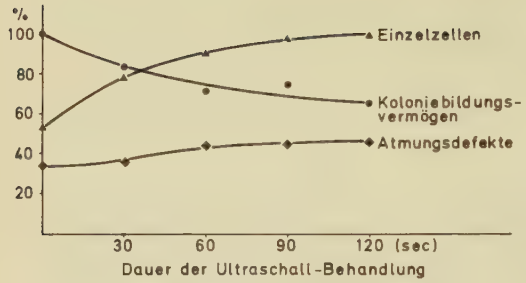


Abb. 1:

Einfluß der Ultraschall-Behandlung auf den Anteil an einzelnen und atmungsdefekten Zellen in der Zellsuspension sowie das Koloniebildungsvermögen am Beispiel der rad2-20 Mutante.

auch in geringem Ausmaß - der Atmungsfähigkeit erfolgt. Die mittelsensiblen Stämme verhalten sich ähnlich. Die Ultraschallbehandlung kann also keineswegs so lange durchgeführt werden, bis nur noch Einzelzellen vorliegen.

Als Kompromiß wurde deshalb eine Behandlungszeit von 30 s gewählt.

Die mutagene Wirkung von Ultraschall wurde nicht untersucht. BAKER und THACKER (1973) und THAKER (1973) testeten die Wirkung von Ultraschall (20 kHz) auf Vorwärtsmutation und mitotische Rekombination an verschiedenen nuklearen Genen bei Saccharomyces und fanden selbst bei einer Abtötung der Zellen bis zu 0,1 % Überlebenden keinen mutagenen Effekt.

2.5 Genetische Analysen

2.5.1 Kreuzung von Haplonten

Zwei Haplonten unterschiedlichen Paarungstyps (PT) werden über Nacht auf VM vorkultiviert und werden dann durch Überstempeln oder Überimpfen auf einer VM-Platte zusammengebracht. Nach 3 bis 5 Stunden Bebrütung bei 30°C sind die ersten Zygoten mikroskopisch sichtbar.

Wenn man nach 24 Stunden Verdünnungsausstriche der gemischten Kultur herstellt, lassen sich nach weiteren 24 bis 48 Stunden Bebrütung an Hand der unterschiedlichen Koloniegröße Diplonten von Haplonten unterscheiden. Nur Diplonten mit einwandfreiem Zellbild, guter Wachstumsfähigkeit und geringer spontaner Mutationsrate zur Atmungsdefizienz werden weiterverarbeitet.

2.5.2 Sporulation

Man kann $a\alpha$-Diplonten zur Meiose veranlassen, indem man sie von einem üppigen Nährmedium (Praesporulationsmedium) auf ein Hungermedium (Sporulationsmedium) überimpft.

Die diploiden Stämme werden 24 Stunden auf Praesporulationsmedium angezüchtet, mit Puffer abgespült, zentrifugiert, zweimal gewaschen, in 10 ml Sporulationsmedium überführt und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bei 30°C unter guter Belüftung geschüttelt. Nach 3 bis 4 Tagen treten Asci auf.

Wenn eine ausreichende Zahl an Asci mit 4 Sporen gebildet wird, ist eine Tetradenanalyse mit Hilfe eines Mikromanipulators zur Isolierung der Meioseprodukte sinnvoll. Wenn jedoch nur wenige Asci gebildet werden und außerdem kaum Asci mit 4 Sporen, kann zur Isolierung der Sporen das Massensporulationsverfahren angewandt werden (EMEIS und GUTZ 1958).

Arbeitsgang bei der Massensporulation:

- Sporulationsansatz zweimal mit Puffer waschen, abzentrifugieren, in 3 ml Puffer aufnehmen und 1, 5 ml einer 1:3 verdünnten Schneckenenzymlösung (Suc digestif d´helix pomatia, L´Industrie Biologique Francaise) zugeben, 12 Stunden bei 30°C schütteln,
- mit 5 ml Puffer versetzen, zentrifugieren,
- Zentrifugat mit 4 ml Tween 80 (1:200 in Puffer verdünnt, im folgenden als Tween-Lösung bezeichnet) kräftig schütteln, zentrifugieren,
- Zentrifugat mit 4 ml Tween-Lösung versetzen, kräftig schütteln. 45 s Behandlung mit Ultraschall bei Intensität 4 ohne Kühlung, damit möglichst viele vegetative Zellen zerstört werden,
- Zugabe von 2 ml Paraffinöl, nach kräftigem Schütteln zentrifugieren. Durch diesen Arbeitsschritt soll eine Trennung der lipophilen Sporen von den lipophoben vegetativen Zellen erreicht werden,
- Abhebern der überstehenden Ölschicht; kräftige Durchmischung mit 2 ml Tween-Lösung und 2 ml Paraffin, zentrifugieren,
- 0, 1 ml des Ölüberstandes auf eine VM-Platte bringen und mit einem abgeflammten Glasspatel verstreichen, dann über weitere 2 bis 3 Platten streichen.

Die Platten werden bei 30°C bebrütet. Nach 2 bis 3 Tagen können die haploiden Klone abgeimpft und weiteruntersucht werden.

2.5.3 Paarungstyp-Bestimmung

Um den Paarungstyp zu bestimmen, wird der neuisolierte Stamm mit je einem a und α Teststamm gekreuzt. Da nur Zellen mit entgegengesetztem Paarungstyp miteinander kopulieren und Zygoten bilden können, läßt sich daraus, mit welchem Teststamm Zygoten gebildet werden, leicht feststellen, welchen Paarungstyp der Stamm besitzt.

2.5.4 Bestimmung der Atmungsfähigkeit

Atmungskompetente Zellen können als Energiequelle Glucose und

Glycerin verwenden, d.h. sowohl auf VM und GM Kolonien bilden, während atmungsdefekte Zellen nur Glucose, aber nicht Glycerin durch Gärung verarbeiten können und deshalb also auf GM keine Kolonien bilden.
Durch Stempeln (Stempeltechnik nach LEDERBERG und LEDERBERG 1952) der Kolonien einer VM oder MM Platte läßt sich die Atmungsdefizienz einer Kolonie daran feststellen, daß sie auf GM nicht wächst.

Man kann sich das Stempeln ersparen, wenn man die zu testende Suspension außer auf MM bzw. VM auch auf GM+G ausplattiert. Auf diesem Medium wachsen die atmungskompetenten Zellen zu normal großen Kolonien auf, während die atmungsdefekten als winzige Kolonien mit bloßem Auge gerade zu erkennen sind. Der Anteil an atmungsdefekten Kolonien, der sich bei dieser Methode der direkten Plattierung ergibt, entspricht dem, den man durch Stempeln auf GM erhält. Das bedeutet, daß Glycerin-Medium nicht selber Atmungsdefizienz induziert im Gegensatz z.B. zu Natriumlaktat-Medium (ECKARDT, unveröffentlicht).

2.5.5 Schnelltests zur Bestimmung der Strahlensensibilität

Diese von LASKOWSKI et al. 1968 und AVERBECK 1970 beschriebenen Methoden ermöglichen den schnellen Nachweis verschieden sensibler Hefestämme.

Bei der Sektorenausstrichmethode werden Proben der zu untersuchenden Stämme in radialen Sektoren (8 bis 10) mit der Öse ausgestrichen. Während der Bestrahlung schützt eine Bleiblende, die mit einer Haltevorrichtung auf die Petrischale gelegt werden kann, die Zellen im Zentrum der Platte vor Abtötung, während die Zellen im radialen Ring je nach ihrer Sensibilität unterschiedlich stark abgetötet werden. Bei Haplonten führt eine Dosis von 120 erg mm^{-2} bei

rad ? Stämmen zu einer völligen Abtötung der ungeschützten Zellen, bei r^s_1 und r^s_2 Stämmen wächst eine große Anzahl an Kolonien auf, während es beim Wildtyp zu einer Rasenbildung kommt wie im unbestrahlten, zentralen Kontrollfeld.
Eine entsprechende Abstufung ergibt eine Bestrahlung von 240 erg mm^{-2} bei den zugehörigen Diplonten.

Bei dem Schnelltest-Verfahren von AVERBECK wird eine Probe des zu testenden Stammes über der gesamten Platte verspatelt und mit Bleiblende geschützt bestrahlt. Damit wird der Nachweis geringer Sensibilitätsunterschiede möglich.

2.5.6 Unterscheidung von Locus- und Suppressormutanten

Als echte Rückmutanten oder Locusmutanten bezeichnet man alle die Revertanten, die durch Rückmutation des ursprünglich mutierten Codons entstehen, während Suppressormutanten nur phänotypisch Wildtyp-Verhalten zeigen, jedoch auf eine zweite, die erste kompensierende Mutation an anderer Stelle im Genom zurückgehen. Am bekanntesten in der Gruppe der intergenischen Suppressoren sind die, die auf mutierte transfer-RNS zurückgehen. Durch eine Mutation im Genbereich, der das Anticodon codiert, wird die betreffende t-RNS in die Lage versetzt, nonsense-Codone der m-RNS zu lesen. Diese Mutation hat pleiotropen Effekt, da nonsense-Codone gleichen Typs in verschiedenen Genen supprimiert werden können; man spricht deshalb von Supersuppression.

Da eine genetische Analyse der Revertanten langwierig und bei der großen Zahl der Mutanten sehr mühsam ist, kann man durch einen relativ einfachen Test Supersuppressoren von den anderen Mutantentypen unterscheiden, wenn man in dem untersuchten Stammsystem zwei Mutationen des gleichen nonsense-Typs hat, wie im vorliegenden Fall ade2-1 und lys2-1. Die auf den jeweiligen Mangelmedien aufgewachs-

senen Mutanten werden auf das entgegengesetzte Mangelmedium gestempelt. Wenn sie auch darauf aufwachsen, d.h. den Phänotyp ADE und LYS haben, sind sie durch Supersuppression entstanden, da die Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen Induktion echter Rückmutationen in beiden Loci sehr klein ist. Wenn sie dies nicht tun, d.h. den Phänotyp ADE lys bzw. ade LYS haben, sind sie mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit auf eine echte Rückmutation zurückzuführen, da nach HAWTHORNE (1969) nur ca. 3,5% der ochre-Suppressoren die lys2-1 Mutation allein und nicht die ade2-1 Mutation supprimieren. Wenn im folgenden von "Suppressormutation" gesprochen wird, ist dies als Kurzform für "Supersuppression" aufzufassen.

2.6 Bestimmung der UV-induzierten Mutationsrate

2.6.1 Prinzip des Rückmutationstests

Der Einfluß der UV-Bestrahlung auf die Mutationsauslösung wird mit einem Rückmutationstest durchgeführt, d.h. es wird die UV-abhängige Mutationsrate von der Auxotrophie zur Prototrophie getestet. Dies ist technisch einfach durchführbar, da es sich um ein Selektionsverfahren handelt: Suspensionen von hohem Zelltiter werden auf Mangelmedien ausgeplattet, auf denen nur die prototrophen Zellen, die die entsprechende Synthesefähigkeit zurückgewonnen haben, Kolonien bilden können. So ist die Isolierung von einer Mutante aus einer Population von 10^7 bis 10^8 Zellen möglich.
Ein Nachteil der Methode liegt darin, daß die phänotypisch gleichen Prototrophen unterschiedliche genetische Konstitution haben.

Bei der Durchführung des Rückmutationstests sind einige Fehlermöglichkeiten zu bedenken, die von HAEFNER (1961, 1965) und AUERBACH und RAMSAY (1971) ausführlich diskutiert und experimentell erforscht wurden:

- Unterschiedliche UV-Sensibilität von prototrophen und auxotrophen Zellen kann zu einer Selektion der Prototrophen der Ausgangs-

suspension führen.

- Zu dichte Suspensionen können den Aufwuchs der Prototrophen hindern.
- Restteilungen der Auxotrophen können zu spontaner Mutation zur Prototrophie führen.
- Unterschiedliche Teilungsgeschwindigkeit der Zellen auf Mangel- und Minimalmedien kann zu unterschiedlichen Überlebensraten führen.

In allen Fällen wurde von den Autoren - wenn überhaupt - ein geringer Effekt gefunden, der die Mutationsrate kaum beeinflußte. Deshalb wurden in dieser Arbeit diese Fehlerquellen nicht nochmals auf ihren möglichen Einfluß hin überprüft, obwohl mit einem anderen Mutationssystem gearbeitet wurde.

2.6.2 Rechnerischer Ansatz

Für den rechnerischen und damit auch für den experimentellen Ansatz sind verschiedene Faktoren zu berücksichtigen, die die Mutationsrate bestimmen. Auch darüber findet sich bei HAEFNER (1961, 1965), HAEFNER und LASKOWSKI (1963) eine ausführliche Diskussion.

Es gilt folgendes:

- In einer Population mit Z_o teilungsfähigen (zur Koloniebildung fähigen) Zellen sind bereits P prototrophe Zellen vorhanden.
- Durch die UV-Dosis D werden Mutanten induziert.
  Demzufolge setzt sich die bei der Dosis D bestimmte Zahl N an prototrophen Mutanten zusammen aus induzierten und die Bestrahlung überlebenden, spontan entstandenen Prototrophen.
- Durch die UV-Dosis D werden auch Zellen inaktiviert.
  Dabei wird die Annahme gemacht, daß sich Mutation und Inakti-

vierung ungestört überlagern, d.h. die bei Bestrahlung entstehenden Mutanten in der gleichen Weise inaktiviert werden wie die auxotrophen Zellen und die bereits in der Suspension vorhandenen Prototrophen.

D.h. für alle Zellen gilt dasselbe ü(D). ü ist definiert als Verhältnis der teilungsfähigen Zellen nach Bestrahlung Z(D) zu Z_o

$$ü(D) = \frac{Z(D)}{Z_o}$$

- Es berechnet sich demzufolge die Mutationsrate m(D), definiert als die Zahl der Mutanten unter den überlebenden Zellen bei der Dosis D zu

$$m(D) = \frac{N(D) - ü(D) \cdot P}{ü(D) \cdot Z_o}$$

2.6.3 Experimentelle Durchführung

2.6.3.1 Vorbereitung der Zellsuspension

a) Anzucht

- Dauerkultur
  Da sich in der Stammkultur beim Lagern schnell atmungsdefekte Zellen anreichern, wird in ca. vierwöchigem Abstand eine Dauerkultur auf GM angezüchtet, wodurch der Anteil an atmungsdefekten herabgedrückt wird.
- Vorkultur I
  Anzucht der Zellen in flüssigem GM+G Medium
- Vorkultur II
  Auf 20 bis 30 VM oder GM Platten wird jeweils die gleiche Menge Suspension der Vorkultur I pipettiert und verspatelt. Nach zwei Tagen werden die Zellrasen auf Mangelmedien gestempelt, auf denen nach 5 Tagen der Aufwuchs an Prototrophen bestimmt wird. Die Kulturen mit der geringsten Zahl an Mutanten werden für den Versuch verwendet.
  Je nach Versuch werden 4 bis 6 Vorkulturplatten benötigt.

b) Suspensionsgewinnung

- Abwaschen der Zellen jeder Platte in ein Zentrifugenglas, abzentrifugieren, (3 min bei 3 000 U/min)

- Aufnahme des Pellets in 5 ml Puffer,
  30 s Ultraschall-Behandlung, abzentrifugieren,
- zweimal waschen (Aufnahme des Pellets in 5 ml Puffer, abzentrifugieren),
- zweimal fraktioniert zentrifugieren (Aufnahme des Pellets in 8 ml Puffer, 2 min 45 s bei 1 000 U/min), Abnahme von 2,5 ml.
  Die nach fraktioniertem Zentrifugieren entnommene Fraktion enthält fast ausschließlich Einzelzellen. Aus allen Röhrchen gesammelt, stellen sie die Ausgangssuspension dar.

c) Titer-Bestimmung

Die Bestimmung des Titers erfolgt mit einer BÜRCKER-TÜRCK-Zählkammer.
In jedem Experiment muß ein Titer von mindestens 10^7 Zellen/0,1 ml vorhanden sein.

2.6.3.2 Durchführung der Bestrahlung

Bei der Bestrahlung dichter Suspensionen tritt das Problem auf, daß sich die Zellen gegenseitig abschatten. Das bedeutet, daß die Zahl der Quanten, die jede Zelle treffen und für die auftretenden Effekte verantwortlich sind, kleiner ist als die, die auf der Oberfläche der Zellsuspension mit dem Quantenflußmesser gemessen wird. Damit verschiedene Experimente vergleichbar werden, muß die wirksame Dosis bestimmt werden.

Nach HAEFNER (1965) können Hefezellen bis zu einem Titer von 10^5/0,1 ml ohne erkennbare Abschattungseffekte bestrahlt werden. Bei hochsensiblen Stämmen kann jedoch bereits bei sehr kurzen Bestrahlungszeiten (Sekunden) ab 10^4/0,1 ml Abschattung eintreten (YASUI, pers. Mitteilung). Deshalb wird in jedem Versuch neben der Bestrahlung der Suspension vom Titer 10^7/0,1 ml eine Kontrollbestrahlung von einer verdünnten Suspension der gleichen Zellen durchgeführt. Damit läßt sich nicht nur die abtötende Wirkung der jeweiligen UV-Dosis auf die dichte Suspension feststellen, sondern auch die wirksame Dosis bestimmen.

2.6.4 Auswertung

2.6.4.1 Auszählung

Die Kolonien auf MM werden nach einer Woche, die Mutantenkolonien auf den Mangelmedien nach zwei Wochen ausgezählt. Zwar wächst der größte Teil der Mutanten innerhalb einer Woche auf, jedoch existieren einige sehr langsam wachsende Suppressormutanten, die erst nach ca. 10 Tagen makroskopisch gut sichtbare Kolonien gebildet haben. Nach zwei Wochen ist mit Sicherheit kein Zuwachs mehr zu erwarten.

2.6.4.2. Berechnung und graphische Auftragung

Die Berechnung der Überlebenden bei einer Dosis D erfolgt für die dichte und die verdünnt bestrahlte Suspension.
Die Überlebenswerte der in dichtem Titer bestrahlten Suspension werden zur Berechnung der Mutationsrate herangezogen.

Die Logarithmen der Überlebenswerte, die ohne Abschattung bestimmt wurden, werden über der UV-Dosis aufgetragen.
Diese Dosis-Effekt-Kurve (DEK) bildet das Maß für die Sensibilität des Stammes.

Die Mutationsraten werden nicht direkt über der Dosis aufgetragen, sondern entsprechend dem aus der Abtötung der dichten Suspension jeweils ermittelten Überlebenswert über der Dosis-Effekt-Kurve.
Der zugehörige Dosis-Wert gibt bei diesem Verfahren die wirksame Dosis und damit die Quantenzahlen, die im Mittel jede Zelle tatsächlich getroffen haben und für die letalen und mutativen Ereignisse maßgeblich sind, an.

Wenn der Abhängigkeit der Mutationsrate von der UV-Dosis eine Funktion

$$y = a \cdot x^n$$

zugrunde liegt, bietet sich eine doppelt logarithmische Auftragung der Mutationsrate über der UV-Dosis an, da die Funktion beim Logarithmieren übergeht in

$$\lg y = \lg a + n \cdot \lg x$$

was gleichbedeutend ist mit

$$y' = a' + n \cdot x'$$

Wenn ein von der Dosis unabhängiges n vorliegt, sollten bei doppeltlogarithmischer Auftragung die Werte um eine Gerade streuen; die Ausgleichsgerade ist zu berechnen und in die semilogarithmische Darstellung übertragbar.

Durch die Berechnung des Anstiegs n der Geraden in doppeltlogarithmischer Auftragung erhält man außerdem eine Aussage über den Grad der Funktion, in dem die Mutationsrate von der wirksamen Dosis abhängig ist.

Es wurden pro Stamm 8 bis 10 unabhängige Versuche mit jeweils mehreren Bestrahlungszeiten durchgeführt. Für jede Dosis wurden für die Bestimmung der Überlebenden 3 bis 5 MM Platten, für die Bestimmung der Mutanten 5 bis 10 Mangelmedium Platten parallel ausplattiert.

2.7 Bestimmung der spontanen Mutationsrate

2.7.1 Prinzip des Fluktuationstests

Die exakte Bestimmung der Wahrscheinlichkeit, mit der ein spontanes Mutationsereignis in einer Zellpopulation auftritt, ist nicht durch den prozentualen Anteil der Mutanten an der Population anzugeben. Denn bei einer aufgewachsenen Mutantenkolonie ist nicht mehr feststellbar, ob die mutierte Stammzelle auf ein spontanes Mutationsereignis zurückgeht oder durch Teilung aus einer mutierten Zelle entstanden ist.

Der von LURIA und DELBRÜCK (1943) entwickelte Fluktuationstest umgeht diese Schwierigkeit, indem er sich nicht auf die Zahl der Mutanten in einer Kultur bezieht, sondern unter einer großen Anzahl an parallel angesetzten Kulturen auf diejenigen, in denen keine Mutanten auftreten.

Unter der Voraussetzung, daß Mutationen seltene Ereignisse sind und zufällig verteilt auftreten, kann zur Berechnung die POISSON-Verteilung, eine Statistik über seltene Ereignisse, angewendet werden:

$$P_{(n)} = \frac{e^{-m} \cdot m^n}{n!}$$

mit n = Anzahl der Mutationsereignisse pro Versuchseinheit

$P_{(n)}$ = Häufigkeit, mit der Versuchseinheiten mit n Mutationsereignissen erwartet werden

m = mittlere Zahl der Mutationsereignisse.

Aus der Häufigkeit der sog. Nullereignisse

$$P_{(o)} = e^{-m} = \frac{N_o}{N}$$

mit N_o = Zahl der Versuchseinheiten ohne Mutanten ("Nullereignis")

N = Gesamtzahl der Versuchseinheiten,

läßt sich m berechnen, ohne daß die Gesamtzahl der in den Versuchseinheiten aufgetretenen Mutationsereignisse bestimmt werden muß:

$$m = \ln \frac{N}{N_o}$$

Problematisch ist die Bezugsgröße, auf die die Häufigkeit der Mutationsereignisse bezogen werden soll.
In der ursprünglichen Theorie von LURIA und DELBRÜCK wird die Zeit als unabhängig Variable angesehen, d.h. die spontane Mutationsrate also definiert als Rate pro Zelle und Generation.

Andere Autoren (KONDO 1972) halten einen Bezug auf die Zahl der Zellen als unabhängige Variable für sinnvoller und definieren die spontane Mutationsrate als Rate pro Zellteilung.

Letztlich unterscheiden sich die beiden Hypothesen nur durch den Einbezug des konstanten Faktors ln 2, so daß ein Vergleich von Mutationsraten verschiedener Stämme, nach derselben Methode berechnet, in jedem Falle Aussagen über die spontane Mutabilität der Stämme erlaubt.

Da viele neuere Untersuchungen dafür sprechen, daß ein Mutationsereignis bei der DNS-Replikation erfolgt, erscheint ein Bezug der Mutationsrate auf die Zellteilung sinnvoll, so daß sich ergibt

$$m_{sp} = \frac{m - Mo}{Z - Z_o}$$

mit M_o = Zahl der inokulierten Mutanten

Z_o = Zahl der inokulierten Zellen

Da beide Größen im Vergleich zu m bzw. Z sehr klein sind, können sie bei der Berechnung der Mutationsrate vernachlässigt werden.

2.7.2 Experimentelle Durchführung

a) Anzucht

erfolgt auf einen VM-Schrägagar

b) Suspensionsgewinnung

wie bei der UV-induzierten Mutation, jedoch ohne Ultraschall-Behandlung (siehe 2.6.3.1.b)

c) Versuchsansatz

36 Zentrifugengläser mit je 1 ml flüssigem VM werden mit je 1000 Zellen beimpft, von denen sich ca. 70 bis 80% bei Ausplattierung auf MM als teilungsfähig erweisen.

Durch Ausplattierung der Ausgangssuspension auf Mangelmedien wird der Anteil der bereits in der Suspension vorhandenen Prototrophen bestimmt. Da dieser bei ca. 10^{-7}/0,1 ml liegt, ist die

Chance sehr klein, daß bereits eine Mutante in einen Versuchsansatz geimpft wird.

Je nach Stamm werden die Ansätze bei 30°C 22 bis 26 Stunden unter Schütteln bebrütet . (In Vortests war für jeden Stamm eine günstige Bebrütungsdauer ermittelt worden, damit genügend Nullereignisse auftreten).

Danach werden die Zellen dreimal mit Puffer gewaschen, um vor dem Ausplattieren auf die Mangelmedien restliche Nährstoffe zu entfernen. 30 Ansätze werden auf je eine Mangelmedium Platte gegeben, von 6 Ansätzen wird die Zahl der Zellen nach Bebrütung bestimmt.

c) Auswertung

Die Auswertung der Mangelmedium Platten, auf denen die Mutanten aufwachsen, erfolgt nach 14 Tagen, da die meisten Mutanten sehr langsam wachsen und erst nach ca. 14 Tagen gut sichtbare Kolonien bilden. Nach 14 Tagen erfolgt keinerlei Nachwuchs an Kolonien mehr.

Pro Stamm wurden 6 bis 8 Parallelversuche durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 UV-Sensibilität

Obwohl der Einfluß der rad Gene auf die Sensibilität bei UV-Bestrahlung bereits untersucht worden ist (LASKOWSKI et al. 1968, AVERBECK 1970, KOWALSKI 1971), war eine erneute, sehr genaue Ermittlung der Überlebenskurve jedes Stammes notwendig. Einerseits ist in den zitierten Arbeiten die Koloniebildungsfähigkeit auf VM und nicht auf MM untersucht worden, andererseits muß der Verlauf der Kurven besonders im Schulterbereich sehr genau bekannt sein, da die Mutationsraten nicht direkt über der Dosis aufgetragen werden, sondern über der DEK jedes Stammes. Die Genauigkeit, mit der die Ab-

tötung eines Stammes durch UV-Bestrahlung bestimmt wird, beeinflußt also die Aussage über die Dosisabhängigkeit der Mutationsraten.

In Abb. 2 sind die DEK für die Sensibilität des Koloniebildungsvermögens der untersuchten haploiden Saccharomyces-Stämme nach UV-Bestrahlung dargestellt.

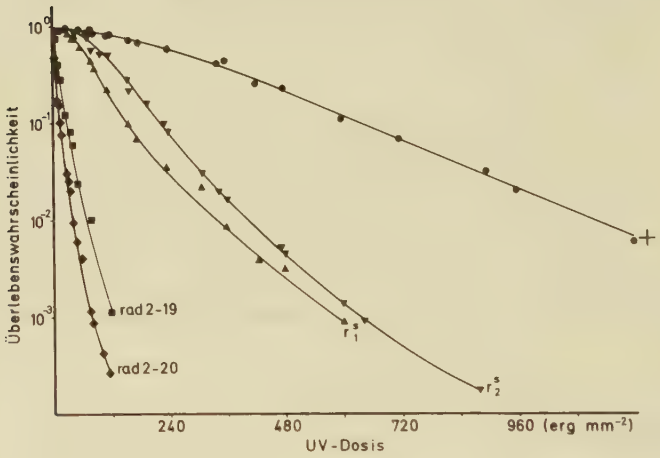


Abb. 2:

UV-Dosis-Effekt-Kurven der sensiblen Mutanten (rad2-19, rad2-20, r^s_1, r^s_2) und des Wildtyps (+).

(Jeder Wert ist aus 2 bis 4 Versuchen gemittelt).

1. Relative Lage der DEK der Mutanten zu Wildtyp-DEK

Die r^s_1 und r^s_2 Stämme zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine mittlere Sensibilität, während die rad2 Stämme hochsensibel sind.

Ein Maß für den Sensibilität bildet der Dosis-Reduktions-Faktor (DRF), der definiert ist als das Verhältnis der Dosis, die benötigt wird, um das Überleben eines Referenz-Stammes (Wildtyp) auf ü zu reduzieren, zu der Dosis, die benötigt wird, um das Überleben des Vergleichsstammes (sensibler Stamm) auf dasselbe ü zu reduzieren.

Etwas anschaulicher als der DRF ist die Angabe des restlichen Reparaturvermögens der sensiblen Stämme, das als prozentualer Anteil der Reparaturkapazität des Wildtyps ausgedrückt werden kann:

$$\% \text{ Reparaturkapazität} = \frac{1}{DRF} \times 100 \quad \%.$$

Als Voraussetzung für dieses Verfahren gilt, daß die Zahl der Schäden proportional mit der Dosis wächst (siehe Diskussion 4.1.3.3) und daß unterschiedlich sensible Stämme bei einer gleichen Überlebenswahrscheinlichkeit im Mittel die gleiche Zahl an nicht reparierten Schäden in ihrem Genom enthalten und nicht etwa unterschiedliche Toleranz gegen UV-Schäden haben.

In Tabelle 2 werden die DRF bei 1 % Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. die Reparaturkapazität der sensiblen Stämme bei 1 % ü dargestellt. Es sei darauf hingewiesen, daß der DRF dosisabhängig ist und daß die Wahl eines bestimmten Überlebensniveaus deshalb willkürlich ist.

Tabelle 2 Dosis-Reduktions-Faktoren der sensiblen Mutanten bzw. deren daraus zu berechnende restliche Reparaturkapazität

Stamm	rad Gen	$DRF_{1\%ü}$	Reparaturkapazität im Vergleich zum Wildtyp bei 1 % ü
2110-222	r_1^s	3,14	31 %
2121-140	r_2^s	2,70	37%
2104-56	rad2-19	14,50	6,9%
2105-15	rad2-20	25,60	3,9%

Die DRF stimmen mit den von KOWALSKI (1971) angegebenen Werten überein.

2. Kurvenverlauf

Die Stämme zeigen charakteristische Kurvenverläufe, die aufgrund der zahlreichen Werte gut gesichert sind:

- Der Wildtyp zeigt eine ausgeprägte Schulter, die ab 10 % ü in einen exakt exponentiellen Abfall übergeht,
- der r_1^s Stamm zeigt eine kleine Schulter, die in einen deutlichen "Bauch" übergeht, an den sich eine starke Schwänzung anschließt,
- der r_2^s Stamm hat eine ausgeprägtere Schulter als der r_1^s Stamm, einen kleineren "Bauch", ab 1% ü jedoch eine ähnliche Schwänzung, d.h. die Kurven der mittelsensiblen Stämme verlaufen bei niedrigen Überlebensraten parallel,
- die rad2 Stämme besitzen keine Schulter (höchstens andeutungsweise der rad2-19 Stamm) und keinen exponentiellen Kurventeil, sondern bereits bei geringer Abtötung eine deutliche Schwänzung.

Besonders auffällig ist bei den sensiblen Stämmen die Schwänzung der Kurven, so daß sich die Frage stellt, ob dies Gründe methodischer Art hat:

1. Anteile von Knospen oder Mehrzell-Gruppen in der Suspension können bei höheren Bestrahlungsdosen sensibilitätsreduzierend wirken.
   Da die Kulturen eine Woche alt sind, treten keine Knospen auf. Der Anteil an Nicht-Einzel-Zellen in den Suspensionen betrug bei allen Stämmen einheitlich 5 bis 8%.
2. Abschattung
   Da UV eine wenig durchdringende Strahlung ist, tritt bei hohen Titern das Problem der Abschattung bei Zelldichten ab ca. 10^6 Zellen/0,1ml (HAEFFNER 1961) auf. Abschattung scheint aber zur Erklärung nicht auszureichen, da sich bei den sensiblen Stämmen

bereits bei 10% ü, d.h. Zelltitern von 10^3/0,1 ml der Schwänzungseffekt andeutet.

Offenbar ist also die Schwänzung ein Charakteristikum des Kurvenverlaufs der sensiblen Stämme.

3.2 UV-induzierte Reversion zur Prototrophie

3.2.1 Problemstellung

Es ist das Ziel strahlenbiologischer Experimente, Hinweise auf die molekularen Abläufe der Reparaturvorgänge und Mutationsmechanismen zu finden.
Problematisch ist dabei die für diesen Zweck häufig ungenügende Spezifität der Untersuchungssysteme.
Es ist nicht möglich, die Wechselwirkung von UV-Quant und DNS-Base auf einen einzigen, genau zu definierenden Ort der DNS zu begrenzen, denn aufgrund der stochastischen Vorgänge finden Wechselwirkungen von vielen UV-Quanten an vielen Stellen der DNS statt.
Das hat u.a. zur Folge, daß phänotypisch gleiche Mutanten genetisch unterschiedlich sind, da sie auf die Veränderung verschiedener Genorte zurückgehen.

Gegenüber der Induktion von Vorwärtsmutanten (Auxotrophiemutanten), scheint die Induktion von Prototrophen in den sog. Rückmutationstests zwar schon spezifischer zu sein, da die Mutation zur Funktionslosigkeit eines Gens zumindest theoretisch, vermutlich jedoch auch in der Praxis, durch Veränderung vieler seiner Nukleotide möglich ist. Dagegen ist die Wiedergewinnung der Funktionsfähigkeit eines mutierten Gens nur durch Mutation einer wesentlich begrenzteren Zahl von Nukleotiden möglich.
Eine Mutation zur Prototrophie kann durch echte Rückmutation (d.h.

durch Mutation des veränderten Codons in seinen ursprünglichen Zustand) und durch intra- und intergenische Suppression erfolgen. In den beiden letzten Fällen wird wildtypartiges Verhalten durch eine zweite Mutation an einem anderen als dem ursprünglichen Codon wiederhergestellt (BRESCH und HAUSMANN 1972).

Günstig ist die Untersuchung von nonsense-Mutanten, da sie nur durch Rückmutation des nonsense-Codons und durch intergenische Suppressoren revertieren können. Die bei missense-und frameshift-Mutanten häufige intragenische Suppression entfällt, so daß die Vielzahl der Möglichkeiten zur Mutation eingeschränkt ist.

Aus diesem Grund wurde die Reversion zur Prototrophie bei den sensiblen Stämmen und dem Wildtyp für die supersupprimierbaren Allele ade2-1 und lys2-1 durchgeführt, d.h. die Mutationsschritte ade → ADE und lys → LYS untersucht.

3.2.2 Induktion oder Selektion der prototrophen Mutanten durch UV ?

Ziel der Arbeit ist es, Auskunft über die Beteiligung von Reparaturvorgängen an der UV-induzierten Mutagenese zu erhalten. Dabei stützen sich alle Aussagen auf die Zahl der Mutanten, die auf den Mangelmedien aufgewachsen sind, d.h. also auf Kolonien, deren Entstehungsursache im Zeitpunkt der Auswertung nicht mehr erfaßt werden kann. Darum ist es entscheidend zu wissen, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Mutanten nicht durch Induktion, sondern durch Selektion entstanden sind. Dabei soll unter Selektion verstanden werden, daß eine Mutante bereits in der Ausgangssuspension vorhanden war und die Bestrahlung aufgrund eines erblichen Selektionsvorteils überlebte, d.h. aufgrund geringerer UV-Sensibilität als sie die übrige Population aufweist.

Unter Induktion soll verstanden werden, daß eine Mutante ihr Entstehen der UV-Einwirkung verdankt, d.h. Folgeerscheinung einer Schadenssetzung ist.

Da der molekulare Ablauf des Mutationsereignisses im entscheidenden Moment nicht verfolgt werden kann, ist man auf indirekte Methoden angewiesen:

1. Untersuchung der absoluten Zahl der Mutanten nach Bestrahlung

Wenn durch Bestrahlung tatsächlich Mutanten induziert werden, sollten zumindest bei niedrigen Dosen nach Bestrahlung mehr Mutanten in der Population vorhanden sein als in der unbestrahlten Kontrollpopulation. Bei höheren Dosen kann die induzierende Wirkung der Bestrahlung durch die abtötende überlagert werden, so daß die Zahl der Mutanten wieder abnimmt. Bei Auftragung der Zahl der Mutanten über der Dosis sollte man also im Falle von Induktion sog. "Induktionskurven" erhalten, während bei Selektion die absolute Zahl der Mutanten nach Bestrahlung nicht die der Kontrolle überschreiten kann.

Methodisches:

- Die Zahl der Mutanten wird bei jeder Dosis auf eine einheitlich große Zellpopulation bezogen, und zwar ungeachtet der Abtötung der Zellen durch UV auf 10^7 Zellen.
- Alle Versuche werden auf einen spontanen Anteil von 0 Mutanten normiert durch Abzug der Mutanten der Kontrolle/10^7 Zellen (N_o) von der Zahl der Mutanten nach UV/10^7 Zellen (N)
- Die Werte $N-N_o$ werden über der jeweiligen Dosis aufgetragen.

Nach diesem Verfahren sind die Abbildungen 3 und 4 entstanden, in denen für alle Stämme die Induktionskurven für die ADE-bzw LYS-Mutanten dargestellt sind.

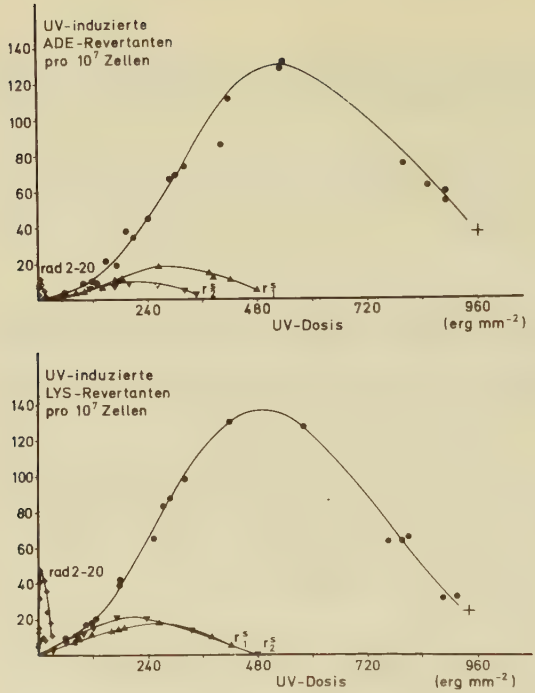


Abb. 3 und 4:

Abhängigkeit der Zahl der UV-induzierten ADENIN- bzw. LYSIN-Revertanten unter 10^7 plattierten Zellen von der UV-Dosis. Es werden die Induktionskurven der sensiblen Mutanten (rad2-20, r_1^s und r_2^s) mit der des Wildtyps (+) verglichen.
Die Werte sind aus mehreren Versuchen gemittelt.

Aussage aus den Graphiken:

- Man erhält bei allen Stämmen und beiden Bedürftigkeiten einen sinusförmigen Kurvenverlauf, wenn auch von unterschiedlicher Höhe und Breite.

  Das bedeutet, daß bei allen Stämmen Induktion nachweisbar ist,

da sich die Mutantenzahlen nach Bestrahlung über das Kontollniveau erheben. Die Werte geben allerdings auch den ungünstigsten Fall an, da die Abtötung der Population und der spontanen Mutanten durch den einheitlichen Bezug auf 10^7 Zellen und den unverminderten Kontrollwert N_o nicht berücksichtigt wurde.

- Auffällig bei dem Vergleich der Kurven ist die sehr gute Induktion beim Wildtyp. Die maximale Induktion von ca. 130 Mutanten/ 10^7 Zellen liegt bei 480 erg mm^{-2} UV, entsprechend ca. 20 % Überlebenden.
- Für den rad2-20 Stamm ist ein relativ enger Induktionsbereich zwischen ca. 8 und 36 erg mm^{-2}, entsprechend bis zu 3% Überlebenden zu finden.
  Für ADE ist nur eine geringe Induktion von 8 bis 10 Mutanten/ 10^7 Zellen nachweisbar, für LYS liegt das Maximum bei 50 Mutanten. Die maximale Induktion findet bei ca. 50% Überlebenden statt.
  In diesem Dosisbereich liegen für den Wildtyp keine experimentellen Werte vor, Interpolation der Kurven läßt jedoch vermuten, daß dort so gut wie keine Induktion stattfindet.
- Der r^s_1 und r^s_2 Stamm zeigen ebenfalls einen Induktionsbogen, wenn auch zum Teil mit sehr niedrigen Werten, die, bei gleicher Dosis verglichen, alle unter der Wildtyp-Kurve liegen. Die Maximalwerte liegen im allgemeinen sogar unter denen des rad2-20 Stammes. Die Induktionsmaxima treten bei einem Überleben von ca. 3 bis 5 % auf.

Wenn auch mit diesem Verfahren nicht ausgeschlossen werden kann, daß Selektion auftritt, so kann doch eindeutig bewiesen werden, daß ein großer Teil der Mutanten durch UV-Induktion entsteht.

2. DEK von isolierten Mutanten

Wenn Mutanten aufgrund einer Sensibilität, die geringer ist als die der übrigen Population, überleben, sollte sich diese Selektion bei

hohen Dosen am stärksten bemerkbar machen. Deshalb sollte bei hohen Dosen die Chance relativ hoch sein, daß unter wahllos abgeimpften Mutanten einige zu finden sind, die höhere UV-Resistenz zeigen als der Originalstamm.

Bei allen sensiblen Stämmen wurden ADE- und LYS-Mutanten bei den höchsten Bestrahlungsdosen (entsprechend 1 bis 5 % Überlebenschance) isoliert, angezüchtet und durch Aufnahme von DEK auf ihre Sensibilität hin überprüft. Keine von ca. 40 Mutanten zeigte im Vergleich zum Originalstamm eine wesentlich erhöhte Sensibilität. Die DEK der Revertanten scharen sich um die Kurve des Originalstammes, wie es in Abb. 5 für 7 ADE-Revertanten von 2105-15 (rad2-20) beispielsweise gezeigt ist.

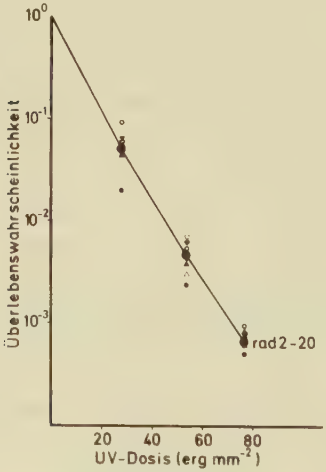


Abb. 5:

Vergleich der adeninbedürftigen rad2-20 Mutante mit 7 ADENIN-Revertanten hinsichtlich der UV-Sensibilität. Die Revertanten sind durch eine UV-Dosis von 40 erg mm^{-2} induziert worden.
Bei jeder UV-Dosis streuen die Werte für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Revertanten um den Wert des Originalstammes.
Jeder Mutante ist ein eigenes Symbol zugeordnet.

Somit ist bewiesen, daß durch UV-Schäden Mutationsereignisse induziert werden, deren Zahl über den spontanen Anteil hinaus geht. Selektion kann nicht völlig ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund der kaum abweichenden Sensibilität der Revertanten vom Originalstamm nicht sehr wahrscheinlich.

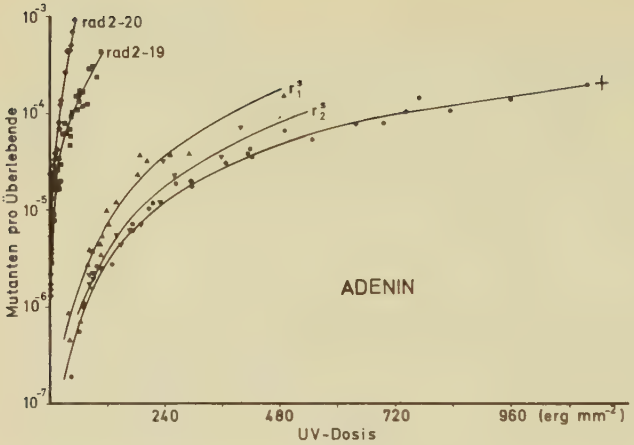
3.2.3 Dosisabhängigkeit der Mutationsraten

3.2.3.1 Abhängigkeit der ADENIN- und LYSIN-Mutationsraten

Nach dem in Material und Methoden angegebenen Verfahren wurden die Mutationsraten experimentell und rechnerisch bestimmt und logarithmisch über der wirksamen Dosis aufgetragen.
In Abb. 6 und 7 sind die Mutationsraten zur ADENIN- (ADE) bzw. LYSIN- (LYS)-Prototrophie der sensiblen Stämme im Vergleich zum Wildtyp aufgetragen.
Die Werte erfassen alle auf den Mangelmedien aufgewachsenen Mutanten ohne Differenzierung in Locus- und Suppressormutanten.
In den Abb. 8 bis 12 sind die Mutationswerte in doppeltlogarithmischer Auftragung über der Dosis für jeden Stamm einzeln dargestellt.

Aus den Graphiken ist ersichtlich:

- Bei allen Stämmen zeigt sich für beide Loci eine Abhängigkeit der Mutationsrate von der Dosis.
- Bei allen Stämmen laufen die ADE-Kurven den LYS-Kurven nahezu parallel, wobei die LYS-Rate höher liegt als die ADE-Rate. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.
- Die beiden rad2-Stämme zeigen einen sehr steilen Anstieg der Mutationskurven mit der Dosis. Bei einer Dosisdifferenz von 40 erg mm^{-2} steigt die Mutationsrate um den Faktor 100.



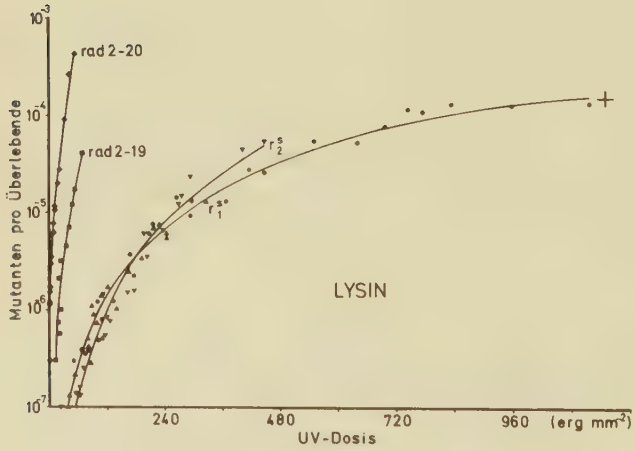


Abb. 6 und 7:

Abhängigkeit der UV-induzierten ADENIN - bzw. LYSIN-Mutationsraten von der UV-Dosis von den strahlensensiblen Mutanten und dem Wildtyp (semilogarithmische Auftragung). Jedes Symbol stellt einen experimentell ermittelten Wert dar.
Die Ausgleichskurven sind aus den Abb. 8 bis 12 übertragen.

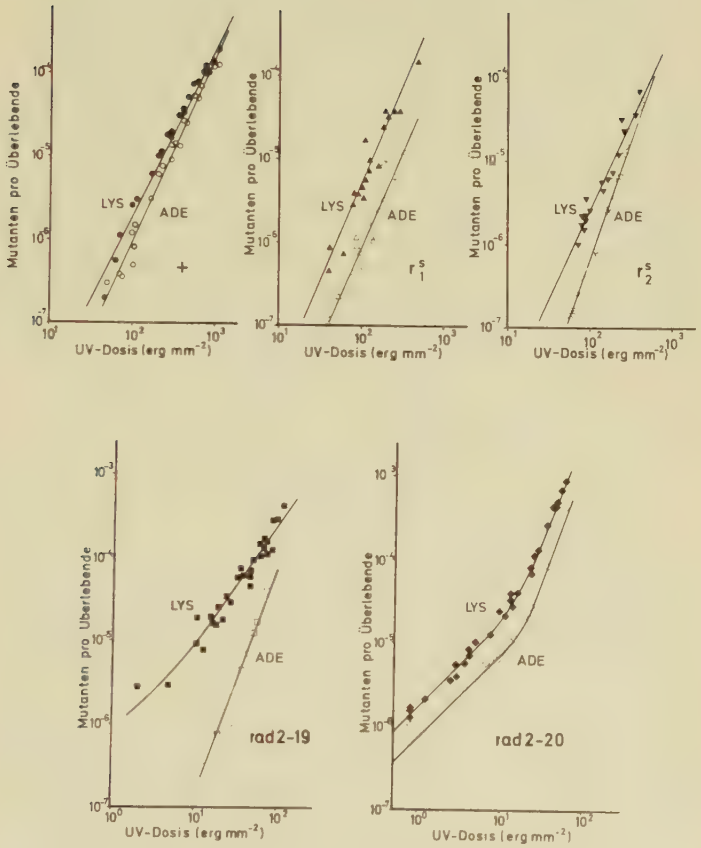


Abb. 8 bis 12:

Abhängigkeit der UV-induzierten ADENIN- und LYSIN-Mutationsraten von der UV-Dosis (doppeltlogarithmische Auftragung der Werte aus Abb. 6 und 7).
Für den Wildtyp (+), die r^s_1 und r^s_2 Mutante wurden die Ausgleichsgeraden berechnet, für die rad2 Mutanten wurden die Ausgleichskurven nach Augenmaß eingezeichnet. Die ausgefüllten Symbole kennzeichnen die LYSIN-, die hohlen die ADENIN-Werte.

- Die übrigen Stämme, Wildtyp, r^s_1 und r^s_2 Mutante, zeigen einen wesentlich weniger steilen Anstieg der Kurven. Bei niedrigen Dosisbereichen ist ein Zuwachs um 240 erg mm^{-2} nötig, um die Mutationsrate um den Faktor 100 zu erhöhen. Das bedeutet, daß im Vergleich zu den rad2 Stämmen die sechsfache Zahl an Schäden angeboten werden muß, damit ein mutativer Schaden tatsächlich realisiert wird. Mit steigender Dosis sinkt die Zuwachsrate, die Kurven flachen sich ab und streben ggf. sogar ein Plateau an.

- Ein Vergleich der Mutationsraten der Stämme bei gleicher Dosis (gleicher Zahl an UV-induzierten Schäden) zeigt einen erheblichen Unterschied in der Mutabilität.
Ein Vergleich ist nur bis zu einer Dosis von 60 erg mm^{-2} möglich, da bei dem sensibelsten Stamm bei weiteren Dosen keine Mutationsraten bestimmt werden können, weil die Abtötung die Induktion von Mutanten übersteigt.

Ein Vergleich bei 60 erg mm^{-2} ergibt für:

Stamm	ADE-Rate	LYS-Rate	Überlebensrate
rad2	$4{,}5 \times 10^{-4}$	10^{-3}	2×10^{-3}
WT, r^s_1, r^s_2	1 bis 2×10^{-7}	ca. 10^{-6}	6 bis 9×10^{-1}

Die rad2 Stämme zeigen also einen Größenunterschied von ca. 10^3 in der Wirkung auf Mutation und Letalität im Vergleich zu den mittelsensiblen Stämmen und dem Wildtyp.
Da bei diesen niedrigen Dosen die Überlebenswahrscheinlichkeit für den r^s_1 und r^s_2 Stamm kaum von der des Wildtyps abweicht, ist eine bei gleicher Dosis nahezu identische Mutationsrate nicht verwunderlich.

Aber selbst bei höherer Dosis, z.B. 380 erg mm^{-2}, bei der der r_1^s und r_2^s Stamm eine Überlebenswahrscheinlichkeit um 1 % gegenüber 35 % bei dem Wildtyp zeigt, ist die Mutationsrate aller drei Stämme nahezu gleich.

Im dosisabhängigen Mutationsverhalten der Stämme zeigt sich also ein interessanter Unterschied im Vergleich zu der Sensibilität des Koloniebildungsvermögens:
In Bezug auf die Empfindlichkeit gegen letale Schäden nehmen der r_1^s und r_2^s Stamm eine mittlere Stellung zwischen dem Wildtyp und den rad2 Stämmen ein, während die stark mutierenden rad2 Stämme der Gruppe der wesentlich geringer mutierenden Stämme, Wildtyp, r_1^s und r_2^s Stamm allein gegenüberstehen.

3.2.3.2 Mutationsverhalten anderer Allele

In orientierenden Versuchen wurde auch die Reversion von his3 → His und ura1 → URA in denselben Stämmen untersucht, und es stellte sich heraus, daß auch bei diesen Loci dieselbe Tendenz auftritt wie bei der ADE- und LYS-Reversion: die Mutationsraten der r_1^s und r_2^s Mutante befinden sich im Wildtyp-Bereich.
Auf eine detaillierte Untersuchung wurde verzichtet, da die HIS- und URA-Raten um den Faktor 10 niedriger liegen als die ADE- und LYS-Raten und daher die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufgrund der geringen Koloniezahlen pro Platte schlechter ist.

Wichtig aber erscheint das einheitliche Ergebnis bei den untersuchten Loci, daß der r_1^s und r_2^s Stamm die gleiche Dosisabhängigkeit der Mutationsrate zeigen wie der Wildtyp. Dieses Ergebnis scheint nicht allelspezifisch zu sein, da his3 und ura1 zwar im Mutationstyp nicht bekannt sind, aber aufgrund der fehlenden Supersupprimierbarkeit

zusammen mit ade2-1 und lys2-1 offenbar keine ochre-Codone darstellen.

Dieses Ergebnis unterscheidet sich von dem bei AVERBECK et al. 1970 beschriebenen, wo der Einfluß der rad Gene auf die Reversion zur Isoleucin-Valin-Prototrophie in den originalen rad Stämmen, d.h. ggf. in einem anderen genetischen Hintergrund getestet wurde.
Bei Wiederholung der Versuche unter verbesserten Anzuchtbedingungen konnte zwar nachgewiesen werden, daß die r^s_{3-1} und r^s_2 Mutante entgegen der dortigen Ergebnisse UV-induzierte Mutabilität zeigen. Wie zu erwarten ist, liegt die Mutationsrate für den r^s_{3-1} (= rad2-19) Stamm im Bereich der Rate der rad2-20 Mutante, die vom r^s_2 Stamm im Bereich zwischen dem r^s_1 Stamm und dem Wildtyp.
Es wiederholte sich jedoch das Ergebnis, daß der r^s_1 Stamm eine höhere Mutabilität als der Wildtyp zeigt.

Es ist durchaus möglich, daß es sich hier nun doch um ein allelspezifisches Verhalten des r^s_1 Stammes handelt. Bekannt ist z.B., daß das rev2 Gen bei nonsense-Codonen eine drastische Reduktion der UV-induzierten Mutationsrate im Vergleich zum Wildtyp bewirkt, jedoch bei einem missense-Codon nicht (LEMONTT 1970). Es ist jedoch auch möglich, daß leakyness des als missense-Mutation bekannten ilv2 Gens (HAWTHORNE und FRIIS 1964) verantwortlich zu machen ist. Eine eindeutige Identifizierung echter Revertanten wurde durch den starken Hintergrund kleinster Kolonien ($\emptyset \leq 0,1$ mm) sowie einer wöchentlichen Zunahme an Prototrophen stark erschwert. Möglicherweise läßt sich das ILV-Mutationsverhalten des r^s_1 Stammes hierauf zurückführen.

3.2.3.3 Vergleich mit anderen UV-sensiblen Bakterien- und Hefemutanten

Die Reaktion der rad2 Stämme auf die abtötende und mutagene Wirkung von UV-Strahlung entspricht der der Stämme, die im ersten Schritt des EXC-Systems defekt sind, d.h. UV-induzierte Schäden nicht ausschneiden können. Wenn weder letal noch mutagen wirkende Schäden aus der DNS entfernt werden können, zeigt die betreffende Mutante eine steil abfallende Überlebenskurve und eine steil ansteigende Mutationskurve.

Erstmalig wurde die bei den Excision-defekten hcr^- und uvr^- Bakterienstämmen von HILL (1965) und WITKIN (1966a,b) beschrieben.

Unter den sensiblen Hefestämmen zeigen die von RESNICK 1968 isolierten uvs9-2 und uvs9-3 Stämme, der von ZAKHAROV et al. 1970 isolierte uvs_1 Stamm (alle durch GAME und COX 1971 als rad2 Allele identifiziert) und der von MOUSTACCHI 1969 beschriebene uvs_z Stamm (von GAME und COX 1971 als rad1 Allel eingeordnet) eine hohe UV-Sensibilität des Koloniebildungsvermögens und der Mutationsinduktion. Noch bevor der biochemische Nachweis erbracht war, wurde dieses Verhalten in Analogschluß zu den entsprechenden Bakterienstämmen als Hinweis auf die Unfähigkeit zum Ausschneiden von UV-Schäden angesehen und damit die Existenz eines EXC-Systems bei Hefen postuliert.

Für den r_1^s und r_2^s Stamm gibt es wesentlich weniger Beispiele für sensible Stämme, die sich entsprechend verhalten.

Bei Hefen ist die von ZAKHAROV et al. (1970) beschriebene uvs_2 Mutante zu nennen, die gegenüber dem Wildtyp einen DRF von 1,8 in der Überlebenskurve aufweist und eine nur wenig erhöhte Mutabilität zeigt. uvs_2 ist von GAME und COX (1972) als rad4 identifiziert und zusammen mit rad1, rad2 und rad3 zum EXC-System zugehörig erklärt worden.

Unter den sensiblen Bakterienmutanten ist ein Vergleich mit der pol A$^-$ Mutante möglich, einer von de LUCIA und CAIRNS (1969) isolierten Mutante, der die DNS-Polymerase I (Kornberg-Polymerase) fehlt. Die pol A$^-$Mutante zeigt bei UV-Bestrahlung eine ca. 5fach höhere Sensibilität als der Wildtyp (GROSS und GROSS 1969, BOYLE et al. 1970), jedoch dieselbe Mutabilität (WITKIN 1971). Ihre Zugehörigkeit zum EXC-System ist erwiesen (MONK et al. 1971).

3.3 Herstellung und Untersuchung einer r_1^s rad2-20 Doppelmutante

3.3.1 Problemstellung

Für das Mutationsverhalten der r_1^s und r_2^s Mutante lassen sich zwei Erklärungen finden:

- entweder sind die jeweiligen funktionsfähigen Gene an dem Mutationsprozeß nicht beteiligt,
- oder es liegt bei beiden Stämmen ein sehr schwach ausgeprägtes rev Verhalten vor, durch das die Mutationsrate nur gering und zufällig bis auf das Wildtyp-Niveau reduziert wird.

Eine Entscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten ließe das Mutationsverhalten einer r_1^s rad2-20 bzw. r_2^s rad2-20 Doppelmutante zu.

Sollte das R_1^s und R_2^s Genprodukt nicht an dem Mutationsprozeß beteiligt sein, wäre für die Doppelmutante trotz erhöhter Sensibilität die gleiche Mutabilität zu erwarten wie für die rad2-20 Mutante. Eine niedrige Mutationsrate würde den rev Charakter der r^s Mutationen bestätigen.

3.3.2 Herstellung der r_1^s rad2-20 Doppelmutante

Aufgrund des Ergebnisses bei KOWALSKI (1971), daß ade ura Doppelmutanten-Sporen im Vergleich zu ade URA bzw.ADE ura Sporen eine stark reduzierte Lebenschance haben, wurden als Ausgangsstämme zur Herstellung der Doppelmutante die dreifach bedürftigen Stämme 2110-23 (r_1^s) und 2105-178 (rad2-20), beide ade, lys, his und URA,benutzt. Sie besitzen die identische Strahlensensibilität wie die vierfach bedürftigen Stämme mit entsprechendem rad Gen.

Aus den Kreuzungsansätzen wurden nur Diplonten mit gutem Zellbild und guter Atmungsfähigkeit ausgesucht und zur Sporulation angesetzt. In allen Fällen war jedoch die Zahl der gebildeten Asci sehr gering, und es fanden sich kaum Asci mit 4 Sporen, so daß auf eine Tetradenanalyse verzichtet wurde. Die Isolierung von geeigneten Sporen wurde mit Hilfe des Massensporulationsverfahrens durchgeführt.

Die Identifizierung von Doppelmutanten wurde mit folgendem Arbeitsgang durchgeführt, wobei gemäß der Angaben von AVERBECK (1970) davon ausgegangen wurde, daß eine erhöhte Sensibilität der Doppelmutante gegenüber einem rad2 Stamm vorliegt:

- 200 Haplonten-Kolonien aus dem Sporulationsansatz isolieren und in Rastern auf VM impfen, bei 30°C 24 Stunden bebrüten.
- Raster sehr dünn auf VM stempeln und die gestempelte Platte bestrahlen (20 s).
  Bei dieser Bestrahlungszeit wachsen Kolonien, die rad2 Sensibilität haben, nicht auf.
- Ausstreichen der sensib e lsten Kolonien in Sektoren, 5 s UV-Bestrahlung im Strahlenschnelltest-Verfahren.
  Bei dieser Bestrahlungszeit sind rad2 Stämme von Doppelmutanten durch unterschiedliche Ringbildung zu unterscheiden.

- Überprüfung der Atmungsfähigkeit und der Bedürftigkeiten der vermeintlichen Doppelmutanten; Feststellung des Paarungstyps.

- Absicherung des Doppelmutanten-Charakters durch Untersuchung der Komplementationsfähigkeit mit den Eltern. r_1^s rad2-20 Doppelmutanten dürfen weder mit dem r_1^s noch mit dem rad2-20 Elter komplementieren.
  Jede Spore, bei der aufgrund des Schnelltests Doppelmutantencharakter vermutet wurde, wurde entsprechend ihrem Paarungstyp mit dem jeweiligen r_1^s bzw. rad2 Partner gekreuzt. Zur Kontrolle wurden auch die Kreuzungen 2105-15 x 2105-178 (rad2 x rad2), 2105-15 x 222 (rad2 x r_1^s) und 2105-178 x 2110-23 (rad2 x r_1^s) angelegt. 2 Tage lang wurde bei 30°C bebrütet. Dann wurden von den zu prüfenden Sporen und den beiden zugehörigen Kreuzungsmischungen (ohne Isolierung der Diplonten) dünne Sektoren ausgestrichen und im Schnelltest-Verfahren bestrahlt (40 s UV). Es konnten unter 16 vermeintlichen Doppelmutanten 5 Stämme ausgewählt werden, die mit beiden Eltern eindeutig keine Komplementation zeigten.

- Die 5 Doppelmutanten wurden in ihrer UV-Sensibilität durch Aufnahme einer Dosis-Effekt-Kurve überprüft.
  Die DEK lagen alle unter der des rad2-20 Stammes.

Es wurde versucht, nach dem gleichen Verfahren eine r_2^srad2 bzw. $r_1^s r_2^s$ Doppelmutante zu finden, jedoch blieb dies ohne Erfolg. Mutanten, die nach dem Komplementationsverhalten recht eindeutig Doppelmutanten zu sein schienen, zeigten die gleiche oder geringere Sensibilität als der sensiblere der Eltern, wenn DEK angefertigt wurden.
Im Falle des r_1^srad2-20 Stammes konnte die eindeutige genetische Identifizierung als Doppelmutante durch Tetradenanalyse nicht vollzogen werden. Es ist jedoch aufgrund des Komplementationsverhal-

tens und der Sensibilität berechtigt anzunehmen, daß es sich um eine Doppelmutante handelt.

3.3.3 UV-Sensibilität und Mutabilität der r_1^s rad2 Doppelmutante

In Abb. 13 werden die DEK und die UV-induzierten Mutationskurven für die ADE- und LYS Revertanten der Doppelmutante r_1^srad2-20 verglichen mit den entsprechenden Kurven des rad2-20 Stammes.

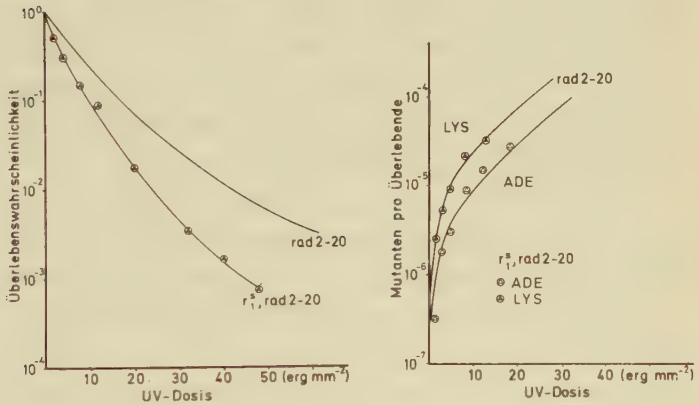


Abb. 13a und b:

Überlebenswahrscheinlichkeiten und UV-induzierte ADENIN- und LYSIN-Mutationsraten der r_1^srad2-20 Doppelmutante und der rad2-20 Mutante in Abhängigkeit von der UV-Dosis.
Die Symbole in Abb. 13b bezeichnen die experimentell ermittelten ADENIN- und LYSIN-Mutationswerte der Doppelmutante.
Die ausgezogenen Kurven sind die aus Abb. 6 und 7 übernommenen ADENIN- und LYSIN-Mutationskurven der rad2-20 Mutante.

Die DEK der Doppelmutante liegt eindeutig tiefer als die der rad2-20 Mutante; bei 1% Überlebenswahrscheinlichkeit ergibt sich ein DRF von 1,8, im Vergleich zum Wildtyp ein DRF von 44,7, der mit dem für den r_2^s rad2-20 Stamm, von AVERBECK (1970) aufgrund einer Tetradenanalyse eindeutig als Doppelmutante nachgewiesen, genau übereinstimmt.
Die Mutationskurven für beide Loci sind mit denen des rad2-20 Stammes identisch.

Es scheint charakteristisch für das r_1^s Gen zu sein, daß es die Fähigkeit zum Überleben nach UV-Bestrahlung mindert, jedoch die Mutationschance nicht beeinflußt.
Damit wird ausgeschlossen, daß das R_1^s Gen einem Reparatursystem angehört, das mit den REV-Funktionen bei Hefen bzw. den REC-Funktionen bei Bakterien hinsichtlich der Beteiligung an Mutationsprozessen vergleichbar wäre.

Problematisch ist die geringe Sensibilitätserhöhung der Doppelmutante im Vergleich zu dem rad2-20 Stamm. Dies provoziert die Frage, ob das R_1^s Gen entgegen der von AVERBECK (1970)vertretenen Hypothese nicht doch einen Schritt des EXC-Systems kontrolliert.
Deshalb sollte diskutiert werden, ob die Einordnung des R_1^s Gens in das Excision Repair System in Erwägung gezogen werden kann.

Ein Vergleich mit den Verhältnissen bei Bakterien ist interessant: in der $uvrA^-$ $polA^-$ Mutante von E. coli ist ebenfalls die UV-Sensibilität etwas erhöht im Vergleich zu der $uvrA^-$ Mutante, die Mutationsrate jedoch identisch (WITKIN und GEORGE 1973).

3.4 Locusspezifität von Reparatursystemen

3.4.1 Problemstellung

Es wurde bereits erwähnt, daß die Untersuchung der Reversion von nonsense-Mutationen günstig ist, da die Zahl der Loci, an denen ein Mutationsereignis zur Prototrophie stattfinden kann, begrenzter ist als bei missense- und AD-DEL-Mutanten, denn es sind nur Mutationen am nonsense-Codon selber oder an Suppressorgenen, die in den meisten Fällen t-RNS codieren, möglich (reviews: GAREN 1968, GORINI 1970).

Als nonsense-Codone sind bei den Bakterien die Codone UAA (ochre), UAG (amber) und UGA (opal), jeweils in der Sequenz der m-RNS angeführt, bekannt.
Mit biochemischen und genetischen Methoden gelang es STEWART und SHERMAN (1972) und STEWART et al. (1972) nachzuweisen, daß auch bei Hefen UAA und UAG als Terminatorzeichen bei der Proteinbiosynthese wirksam sind.
Wenn durch Mutation im Anticodon eine t-RNS in die Lage versetzt wird, mit einem nonsense-Codon zu paaren, wird eine suppressorspezifische Aminosäure eingebaut, und das betreffende Protein wird vollständig synthetisiert.
Diese Suppressoren zeichnen sich durch ihre Allelspezifität aus, d.h. sie können die gleichzeitige Reversion von mehreren Genen mit dem gleichen nonsense-Codon bewirken. Man spricht in diesem Fall von Supersuppression. Bei Hefen sind derartige Supersuppressoren erstmalig von HAWTHORNE und MORTIMER 1963 nachgewiesen worden. Heute sind mindestens 15 Supersuppressorloci in Hefen bekannt und genetisch analysiert bzw. gemäß ihrem phänotypischen Verhalten klassifiziert (MORTIMER und GILMORE 1968, HAWTHORNE 1969a, b).

Besonders geeignet als Testsystem ist ein Hefestamm mit mindestens

zwei Loci mit Codonen von gleichem nonsense-Typ. In einem solchen System kann man einerseits untersuchen, ob beide Codone die gleiche Mutationschance haben oder ob ggf. Nachbarschaftsverhältnisse,Reparaturspezifität u.a. die Mutationschance beeinflussen. Es kann außerdem die Mutabilität von verschiedenen Typen von Genen studiert werden, nämlich den Strukturgenen, die die Information für Proteine codieren und den Genen, die t-RNS codieren, kurz Suppressor-Gene genannt.
Die nonsense-Codone der Strukturgene können nur durch Basen-Paar-Substitution (BPS) ein funktionsfähiges Protein hervorbringen, Additions-Deletions-Mutationen sind sicher erfolglos.
Dagegen konnten MAGNI und PUGLISI (1966) und MAGNI et al.(1966) nachweisen, daß bei Hefen Supersuppressoren bevorzugt durch AD-DEL-Mutationen entstehen, wenn auch BPS im Anticodonbereich nicht ausgeschlossen werden kann (v. BORSTEL et al. 1971).

Unter der Annahme, daß die untersuchten Stämme weitgehend isogen sind, bietet sich in diesem Stammsystem mit mindestens zwei identischen Codonen in zwei Loci die Möglichkeit an, den Einfluß der Reparatur auf zwei Mutationstypen, BPS und AD-DEL-Mutation, zu untersuchen, die in ihrem Entstehungsmechanismus möglicherweise unterschiedlich sind.

3.4.2 Bestimmung der Locus- und Suppressormutationsraten

Die Bestimmung der Locus- bzw. Suppressorraten erfolgte derart, daß die auf den Mangelmedien aufgewachsenen ADE- bzw. LYS-Revertanten auf das jeweils andere Mangelmedium gestempelt wurden. Nach einer Woche Bebrütung bei $30^{\circ}C$ wurden für die Mutanten in der Kontrollsuspension und der bestrahlten Suspension die prozentualen Häufigkeiten bestimmt, mit denen eine einzelne Mutation bzw. Doppelmutation vorlag. Unter Bezug auf die Gesamtmutationsrate und unter Berücksichtigung der Kontrollwerte wurden die Raten

für die Locusmutanten und die Suppressormutanten für beide Bedürftigkeiten berechnet und logarithmisch über der Dosis aufgetragen.

Die Abbildungen 14 bis 17 zeigen für jeden Stamm und für beide Bedürftigkeiten die Locus- bzw. Suppressormutationsraten in Abhängigkeit von der Dosis. Zum Vergleich sind die Gesamtmutationsraten aus den Abbildungen 6 und 7 eingetragen.

Aus den Graphiken geht hervor, daß bei allen Stämmen Locus- und Suppressormutanten induziert werden, jedoch unterscheidet sich der rad2-20 Stamm von den drei übrigen durch das Verhältnis von Locus- und Suppressormutanten. Im Wildtyp, r_1^s und r_2^s Stamm stellen den überwiegenden Teil der Mutanten die Locusmutanten dar, deren Mutationsrate beinahe mit der Gesamtrate übereinstimmt, während die Mutationsrate der Suppressormutanten um den Faktor 10 tiefer liegt.
Im rad2-20 Stamm dagegen sind die Mutationsraten für die LYS Locus- und Suppressormutanten ungefähr gleichgroß, während die ADE-Locusrate geringer als die Suppressorrate ist.
Hier scheint es sich um einen Fall von locusspezifischer Beeinflussung der Mutationsrate in einem reparaturdefekten Stamm zu handeln, da das Verhältnis von Locus- zu Suppressormutationshäufigkeit bei den ADENIN- und LYSIN-Mutanten in der rad2-20 Mutante in unterschiedlicher Weise beeinflußt ist.

Damit der Einfluß der rad Gene auf die Locus- bzw. Suppressorraten besser verglichen werden kann, sind die LYS-Werte aller untersuchter Stämme in der Abbildung 18 zusammengefaßt. Für die ADE-Werte ergibt sich ein entsprechendes Bild.

Die Locus- und Suppressorraten der rad2-20 Mutante zeigen einen steilen Anstieg mit zunehmender UV-Dosis. Die Kurven liegen weit

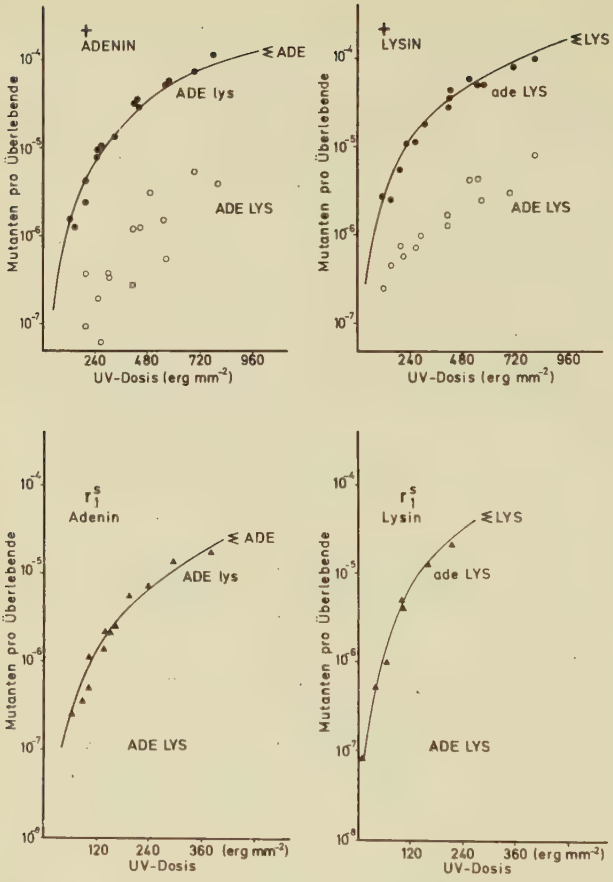


Abb. 14 und 15:

Abhängigkeit der UV-induzierten Locus- und Suppressormutationsrate von der UV-Dosis bei dem Wildtyp (+) und der r^s_1 Mutante.

Für jeden Stamm sind die ADENIN- und LYSIN-Mutationskurven (Σ ADE bzw. ΣLYS) aus Abb. 6 und 7 eingetragen. Die ausgefüllten Symbole kennzeichnen Locusmutation (ADE lys bzw. ade LYS), die hohlen Symbole Suppressormutation (ADE LYS).
Jedes Symbol bezeichnet einen experimentell bestimmten Wert.

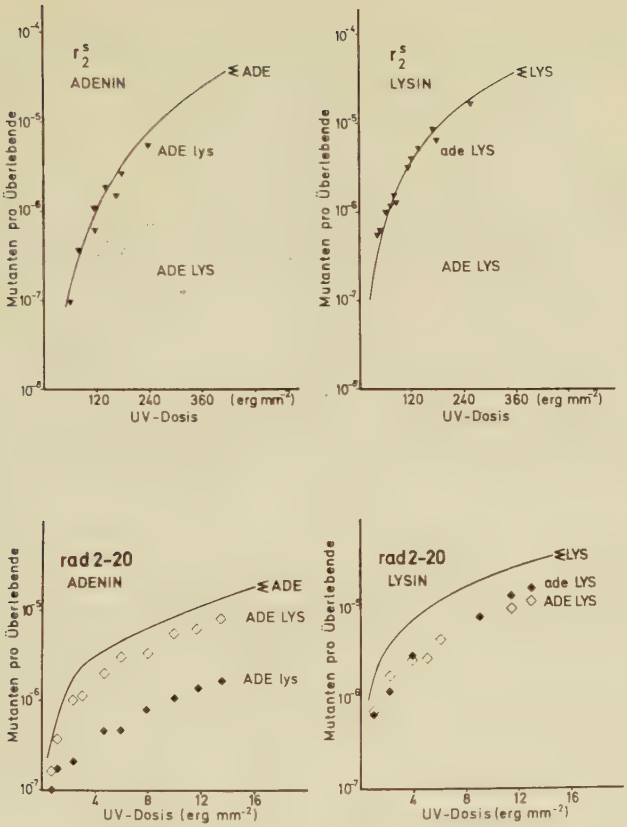


Abb. 16 und 17:

Abhängigkeit der UV-induzierten Locus- und Suppressormutationsrate von der UV-Dosis bei den sensiblen Mutanten r_2^s und rad2-20.

Für jeden Stamm sind die ADENIN- und LYSIN-Mutationskurven (Σ ADE bzw. LYS) aus Abb. 6 und 7 eingetragen. Die ausgefüllten Symbole kennzeichnen Locusmutation (ADE lys bzw. ade LYS), die hohlen Symbole Suppressormutation (ADE LYS).
Jedes Symbol bezeichnet einen experimentell bestimmten Wert.

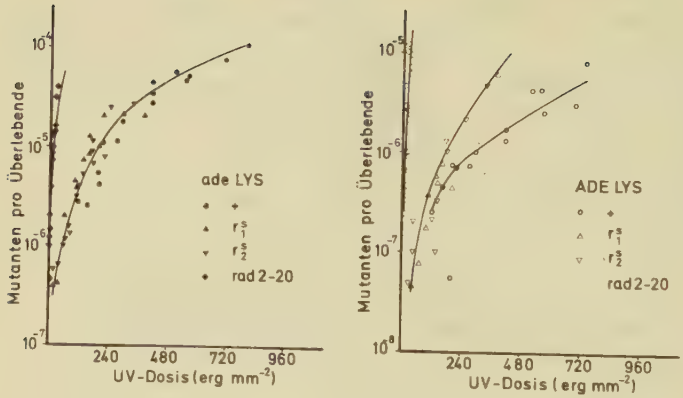


Abb. 18:

Vergleich der UV-induzierten LYSIN-Locus- und -Suppressor-Mutationsraten des Wildtyps und der sensiblen Mutanten über der UV-Dosis.
Die Werte sind aus Abb. 14 bis 17 übernommen.

entfernt von den entsprechenden der übrigen drei Stämme, deren Werte sich in einem gemeinsamen Bereich befinden.
Dabei zeigt sich, daß beim Wildtyp der Anstieg der Locusrate wesentlich steiler verläuft als der der Suppressorrate.
Vergleicht man bei einem Niveau von 10^{-5} Mutanten/Überlebende die DRF für die rad2-20 Mutante und den Wildtyp, so ergibt sich ein DRF von 12 für die Locusrate, ein DRF von ca. 32 für die Suppressorrate. Das bedeutet, daß die 12fache Dosis appliziert werden muß, damit im Wildtyp die Chance für ein mutatives Ereignis am nonsense-Codon so groß ist wie bei dem rad2-20 Stamm. Für die gleiche Chance zu einer Suppressormutation muß sogar die

32fache Dosis aufgestrahlt werden. Das bedeutet aber, daß im rad2-20 Stamm durch den Ausfall des EXC-Systems die Chance für eine Suppressormutation gegenüber einer Locusmutation erhöht ist.

Für den r_1^s und r_2^s Stamm ergibt sich das gewohnte Bild: ihre Mutationsraten stimmen mit der des Wildtyps überein. Allerdings zeigt der r_2^s Stamm für die Suppressormutation die Tendenz einer leichten Erhöhung der Rate um den DRF 1,8 im Vergleich zum Wildtyp.

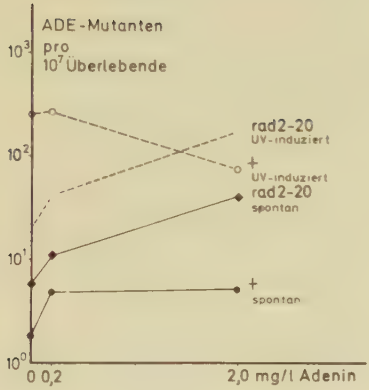
Wenn man von den Unterschieden des rad2-20 Stammes zu den übrigen Stämmen einmal absieht, erstaunt die niedrige Rate der Suppressormutanten gegenüber der Rate der Locusmutanten. Wenn man bedenkt, daß der Mutationschance an einem Locus-Codon theoretisch die Mutationschance von 8 bis 10 Suppressorgenen gegenübersteht, wäre zu erwarten, daß die Mutationsrate der Suppressoren höher ist als die der Locusmutanten. Tatsächlich ist sie aber geringer.
Das entsprechende Ergebnis findet auch RESNICK (1968) bei seinem Wildtyp und der rad2-18 Mutante, ebenso LEMONTT (1970) bei seinem Wildtyp. Dagegen stellen bei Bakterien die Suppressormutanten ca. 90 % der prototrophen Mutanten dar (WITKIN 1966, BRIDGES et al. 1967a,b).
Diese Unterschiede könnten methodische Gründe haben:
Während die Heferevertanten auf Mangelmedien ohne jeglichen Zusatz der Substanz, für deren Synthesefähigkeit selektioniert werden soll, isoliert werden können, wird in den Medien für die Bakterien ein Zusatz von mindestens 1 mg/l der entsprechenden Substanz zugefügt, da die Mutationsrate auf einem reinen Mangelmediun kaum über das Spontanniveau hinausgeht (CHEUNG und BOCKRATH 1973). Wenn eine Spur Nährbrühe zugesetzt wird, erhöht sich die Mutationsrate bei einer hcr^- Mutante nochmals auf das 100fache (WIT-

KIN 1966), bei einem Wildtyp um das 6fache, wobei die Steigerung der Rate zum größten Teil auf die Zunahme an Suppressoren zurückgeht, die auf die geringe Substitution angewiesen sind, um wachsen zu können (BOCKRATH und CHEUNG 1973).

3.4.3 Untersuchungen des Einflusses von Adenin-Substitution im Medium auf die ADE-Rate

Um den Einfluß der Substitution bei Hefen zu testen, wurden im Wildtyp und bei der rad2-20 Mutante die ADE-Revertanten der unbestrahlten und einer bestrahlten Suspension auf reinem Adenin-Mangelmedium und Medien mit Zusatz von 0,2 mg/l und 2 mg/l Adenin (1% bzw. 10 % der Adeninzugabe im Minimalmedium) isoliert. Bei Substitution mit 0,2mg/l Adenin ergab sich kein Restwuchs der auxotrophen Zellen, während bei 2 mg/l Adeninzugabe ein Hintergrundwuchs zu finden war.

In Abbildung 19 a ist die Abhängigkeit der Zahl der Mutanten/ 10^7 Überlebende mit und ohne Bestrahlung in den beiden untersuchten Stämmen dargestellt. Es fällt auf, daß im Wildtyp in der Kontrolle nur bei geringer Substitution ein Zuwachs an Mutanten um den Faktor 2,5 auftritt, höhere Substitution bringt keine weitere Änderung. Bei den induzierten Prototrophen ergibt sich bei geringer Substitution kaum eine Änderung, während bei hoher Substitution sogar eine Abnahme auf ca. 30 % des Kontrollwertes auftritt. Offenbar werden die prototrophen Mutanten durch die Restteilungen der auxotrophen Zellen am Wachstum gehindert.
In der rad2-20 Mutante wird die Zahl der spontanen und durch Bestrahlung induzierten Prototrophen bei 0,2 mg/l Adeninzugabe auf das Doppelte, bei 2 mg/l Adenin um das 7 bis 8fache erhöht, d.h. die Substitution hat bei der bestrahlten Zellpopulation der Mutante eine stärkere Auswirkung als beim Wildtyp.



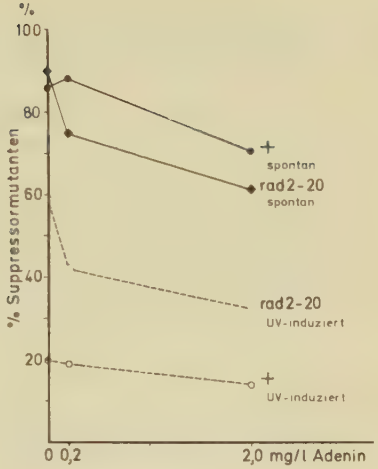


Abb. 19a:

Abhängigkeit der spontanen und UV-induzierten ADENIN-Mutationsrate in Abhängigkeit von der Adenin-Substitution im Mangelmedium beim Wildtyp und der rad2-20 Mutante.
Die UV-Dosen wurden so gewählt, daß bei jedem Stamm ca. 30 % der Zellen überlebten.

Abb. 19b:

Anteil der Suppressormutanten (%) an den spontanen und UV-induzierten ADENIN-Mutanten in Abhängigkeit von der Adenin-Substitution im Mangelmedium.

Es stellt sich die Frage, wie der Effekt der Substitution erklärt werden kann. Wirktdie geringe Menge an Adenin im Medium nur während der ersten Zellteilungen, bevor die eigene Adeninsynthese der Mutante voll angelaufen ist, oder ist immer eine geringe Substitution nötig, weil evtl. die Eigenproduktion der Zelle nicht ausreicht?

Um dies zu entscheiden, wurden die auf substituierten Medien herangewachsenen Mutanten auf Adenin-Mangelmedium (MM-ADE) gestempelt und eine Woche bei 30°C bebrütet.
Die Auswertung ergab für den Wildtyp und die rad2-20 Mutante eindeutig, daß alle spontanen und UV-induzierten Mutanten, die auf angereicherten Nährböden aufgewachsenen waren, auf reinen Mangelmedien ebenfalls wachsen können, d.h. also die Substituierung nur für die Expression der Mutation nötig zu sein scheint.
Damit unterscheiden sich die Revertanten der Hefen, die auf substituierten Medien aufgezogen werden, eindeutig von den entsprechenden Bakterienmutanten, die trotz der Mutation zur Prototrophie weiterhin noch geringe Mengen der betreffenden Substanz zum Wachstum brauchen (BOCKRATH und CHEUNG 1973).

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob durch die Substitution bevorzugt Suppressormutationen in der Expression begünstigt werden, wie es bei Bakterien der Fall ist. Deshalb wurden alle auf MM-Ade, MM +0, 2 mg/l Ade und MM + 2, 0mg/l Ade aufgewachsenen Adenin-Revertanten auf Lysin-Mangelmedium gestempelt. Nach einer Woche Bebrütungszeit wurde der Anteil an Suppressor- und Locusmutanten festgestellt.

In Abb. 19b ist der prozentuale Anteil der Suppressormutanten an der Gesamtzahl der Revertanten in Abhängigkeit von der Adenin-Substitution im Mangelmedium dargestellt.
Wiederum in Abweichung von dem Verhalten der Bakterienmutanten nimmt bei den spontanen und UV-induzierten Mutanten des Wildtyps und der rad2-20 Mutante der Anteil der Suppressormutanten bei Substitution ab.

Grundsätzlich also scheint die Substitution die Expression "schwacher" Mutanten zu begünstigen, denn die geringen Zusätze von Adenin sind

offenbar nur so lange nötig, bis die zelleigene Synthese genügend Adenin liefert. Es sollte jedoch geprüft werden, ob dies ein spezifischer Fall bei der Mutation zur Adenin-Prototrophie oder generell gültig ist.

Da die Abhängigkeit der Mutantenzahl von der Substitution im Medium bei der rad2-20 Mutante wesentlich deutlicher sichtbar ist als im Wildtyp, scheint auch die Reparaturfähigkeit des Stammes einen Einfluß zu haben. Das aber bedeutet, daß die Substitution möglicherweise eine Auswirkung auf den molekularen Ablauf der Mutagenese hat.

3.5 Einfluß der Atmungsfähigkeit einer Population auf die Reparaturkapazität

3.5.1 Problemstellung

Eine mögliche Fehlerquelle bei der Charakterisierung des Einflusses der rad Gene auf die UV-Sensibilität und -Mutabilität könnte der unterschiedlich hohe Anteil an atmungsdefekten Zellen in den Zellpopulationen sein.

Wie bei der Charakterisierung der Stämme bereits erwähnt wurde, ist ein abnormal hoher spontaner Anteil von atmungsdefekten Zellen in der Population Eigenart der Stämme.

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, daß sich Atmungsdefizienz in einer veränderten Reparaturfähigkeit äußern könnte:

1. Nach AVERBECK (1970) können atmungsdefekte Stämme bei Liquid Holding keine Dunkelreparatur ausführen.
   Nach übereinstimmenden Vorstellungen von AVERBECK (1970), PARRY und PARRY (1969) und PARRY (1972) findet auch bei Saccharomyces - wie bei Bakterien - während der Liquid Holding Periode die Reparatur von UV-Schäden mit Hilfe des EXC-Systems statt.

2. v. BORSTEL et al. (1971) haben nachgewiesen, daß atmungsdefekte Zellen als Mutatoren wirken können, z.B. erhöht sich die spontane Locus-Reversionsrate von lys1-1 in einigen atmungsdefekten Stämmen um das 5fache.
   Es ist deshalb durchaus möglich, daß sich auch die UV-induzierte Mutationsrate in atmungsdefekten Stämmen erhöht.

Da die bisherigen Untersuchungen mit "gemischten" Populationen durchgeführt wurden, die aufgrund der VM-Anzucht einen recht erheblichen Teil an atmungsdefekten Zellen enthalten (siehe dazu auch Tabelle 4), boten sich zwei Möglichkeiten an, den Einfluß der Atmungsfähigkeit auf das Reparaturvermögen zu untersuchen:

1. Die Isolierung von atmungsdefekten Stämmen ermöglicht die Überprüfung des Einflusses einer 100%igen Atmungsdefizienz auf die UV-Sensibilität und -Mutabilität.
2. "Gegenprobe" durch Reduzierung des Anteils atmungsdefekter Zellen einer Population durch Anzucht auf GM-Medium.

3.5.2 Experimentelle Ergebnisse

1. Isolierung von petite-Stämmen

Atmungsdefekte Zellen bilden trotz der Adeninbedürftigkeit den roten Farbstoff nicht aus. Zur Isolation von atmungsdefekten Stämmen braucht man deshalb nur auf MM weiße, kleine Kolonien abzuimpfen und auf GM-Medium durch Ausplattierung nochmals auf tatsächlich vorhandene Atmungsdefizienz zu testen.
Von Nachteil ist, daß Atmungsdefizienz nicht durch eine einzige einheitliche Mutation entstehen kann. Verschiedene atmungsdefekte Mutanten können unterschiedliche genetische Konstitution haben und demzufolge unterschiedlich stark reduziertes Atmungsvermögen, was

exakt nur durch Messungen am Warburg-Apparat zu bestimmen wäre. Dies würde jedoch ebenso wie eine genetische Analyse sehr aufwendig sein und wurde deshalb unterlassen.
Deshalb aber ist ein einheitliches Verhalten in den Reparatureigenschaften bei verschiedenen petite-Stämmen nicht zwingend zu erwarten.

Es wurden von dem Wildtyp, dem r_1^s Stamm und dem rad2-20 Stamm folgende petites-Stämme isoliert:

Tabelle 3: Übersicht der atmungsdefekten Stämme

Gen-Symbol	Stamm-bezeichnung	Gen-Symbol	Stamm-bezeichnung	Gen-Symbol	Stamm-bezeichnung
+	235-11c-p_1	r_1^s	2110-222-p_3	rad2-20	2105-15-p_1
	235-11c-p_2		2110-222-p_5		2105-15-p_3
	235-11c-p_3				2105-15-M_1
					2105-15-M_4

Bei einem Test auf die Bedürftigkeiten zeigten alle Stämme eine Häufigkeit an spontanen Revertanten, die der der Originalstämme entsprach. Eine Ausnahme machte der Stamm 2105-15-p_1, der in den unbestrahlten Kontrollen trotz mehrfacher Neuisolierung den ca. 200fachen Anteil an LYS-Suppressoren aufweist an dem gemessen, was in 2105-15 an LYS-Suppressoren aufwächst. Die spontane ADE-Revertantenzahl war annähernd normal. Möglicherweise liegt hier eine spezifische LYS-Suppressor-Mutatoreigenschaft zugrunde.

2. Reduzierung des Anteils an atmungsdefekten Zellen durch GM-Anzucht

Wider Erwarten erhält man mit dieser Methode nicht eine 100 % at-

mungsfähige Population, sondern je nach Stamm durchaus noch 20 bis 40 % atmungsdefekte Zellen.
Da Glycerin nicht vergoren werden, d.h. den atmungsdefekten Zellen nicht als Energielieferant dienen kann, ist dieser Anteil erstaunlich hoch. Offenbar entstehen die atmungsdefekten Zellen auch bei GM-Anzucht spontan, bleiben liegen, ohne sich zu vermehren, sterben aber nicht ab. Wenn sie wieder Glucose im Medium vorfinden, beginnen sie, sich zu teilen.
Die Idee, durch mehrere aufeinander folgende GM-Passagen den Anteil an atmungsdefekten Zellen noch weiter herabzudrücken, erwies sich nicht als günstig, da sich die Zellen aufblähten und in Puffer sehr schnell platzten. Möglicherweise reicht die zelleigene Glucose-Produktion für den Zellwandaufbau nicht aus.

In Abb. 20 wird die unterschiedliche UV-Sensibilität von VM- und GM-Populationen der strahlensensiblen Mutanten und des Wildtyps dargestellt.

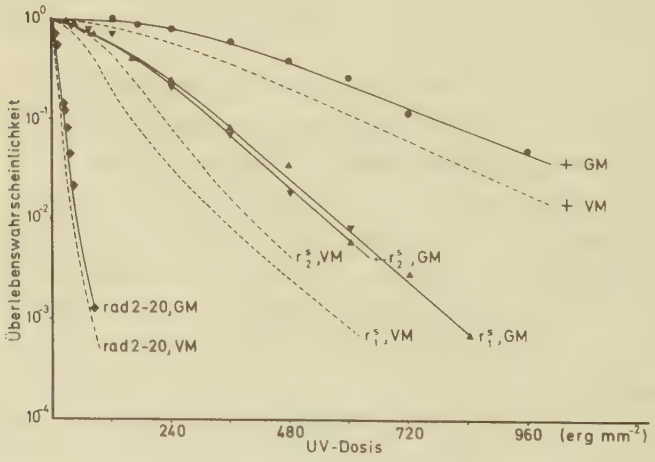


Abb. 20:
Vergleich der UV-Sensibilität von Zellanzuchten auf Glycerinmedium (GM) mit den Anzuchten auf Vollmedium (VM).
Die UV-Dosis-Effekt-Kurven sind für den Wildtyp (+) und die sensiblen Mutanten jeweils für GM und VM dargestellt.
Die Symbole bezeichnen aus 3 bis 5 Versuchen gemittelte Werte.

In Tabelle 4 wird für jeden Stamm der Anteil an atmungsdefekten Zellen in den beiden Anzuchten verglichen, der aus den unbestrahlten Kontrollen mehrerer Versuche gemittelt wurde.
Außerdem gibt die Tabelle 4 Auskunft über die $DRF_{1\%\ ü}$, die aus den DEK in Abb. 20 ermittelt werden können.

Tabelle 4: Vergleich des Anteils atmungsdefekter Zellen und der Dosis-Reduktions-Faktoren bei VM- und GM-Medium.

Stamm	Gen-symbol	% atmungsdefekter Zellen		$DRF_{1\%\ ü}$	
		VM-Anzucht	GM-Anzucht	VM-Anzucht	GM-Anzucht
235-11c	+	73%	30%		
2110-222	r^s_1	88%	42%	3, 14	2, 30
2121-140	r^s_2	70%	22%	2, 70	2, 30
2105-15	rad2-20	62%	26%	25, 60	25, 80

In Abb. 21 bis 23 werden für den Wildtyp, den r^s_1 und den rad2-20 Stamm die DEK für Koloniebildungsvermögen und die ADE- und LYS-Mutationsraten in Abhängigkeit von der Dosis von VM- und GM-Populationen und den petite-Stämmen verglichen.
Die Mutationswerte der GM-Kulturen sind doppeltlogarithmisch über der UV-Dosis in den Abb. 24 bis 27 aufgetragen.

Aus den Graphiken geht hervor:

- Bei dem Wildtyp und dem r^s_1 Stamm führt 100%ige Atmungsdefizienz zu einer Reduktion der Überlebenschance um den Faktor von ca. 1, 25, während die atmungsdefekten Mutanten des rad2-20 Stammes keine eindeutig höhere Sensibilität als der auf VM angezogene Originalstamm haben.

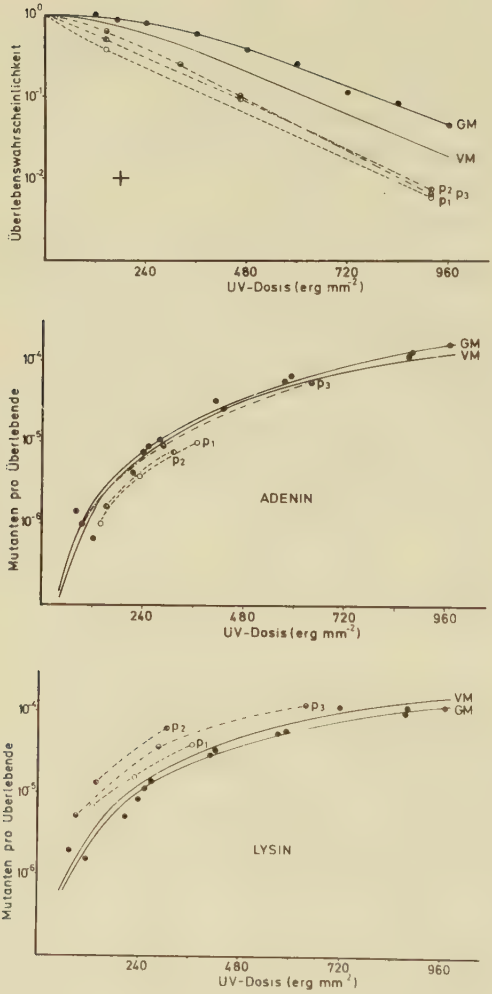


Abb. 21:

Sensibilität und UV-induzierte ADENIN- und LYSIN-Mutationsraten des Wildtyps in Abhängigkeit von der UV-Dosis bei Zellpopulationen mit unterschiedlichen Anteilen atmungsdefekter Zellen: GM-Anzucht (30%), VM-Anzucht (73%), petite-Stämme 235-11c-p_1, -p_2, -p_3 (100%).

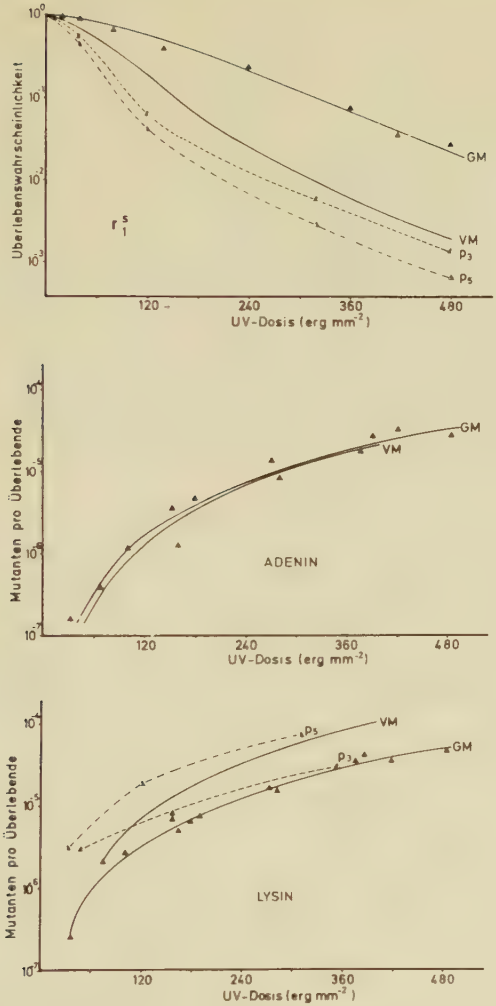


Abb. 22:

Sensibilität und UV-induzierte ADENIN- und LYSIN-Mutationsraten der r_1^s Mutante in Abhängigkeit von der UV-Dosis bei Zellpopulationen mit unterschiedlichen Anteilen atmungsdefekter Zellen: GM-Anzucht (42%), VM-Anzucht (88%), petite-Stämme 2110-222-p_3, -p_5 (100%).

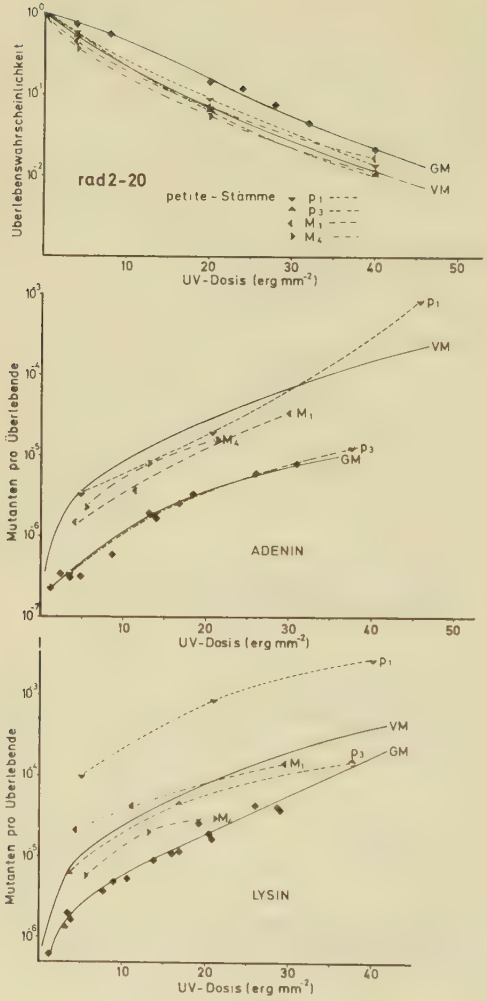


Abb. 23:

Sensibilität und UV-induzierte ADENIN- und LYSIN-Mutationsraten der rad2-20 Mutante in Abhängigkeit von der UV-Dosis bei Zellpopulationen mit unterschiedlichen Anteilen atmungsdefekter Zellen: GM-Anzucht (26%), VM-Anzucht (62%), petite-Stämme 2105-15-P_1, -P_3, -M_1, -M_4 (100%).

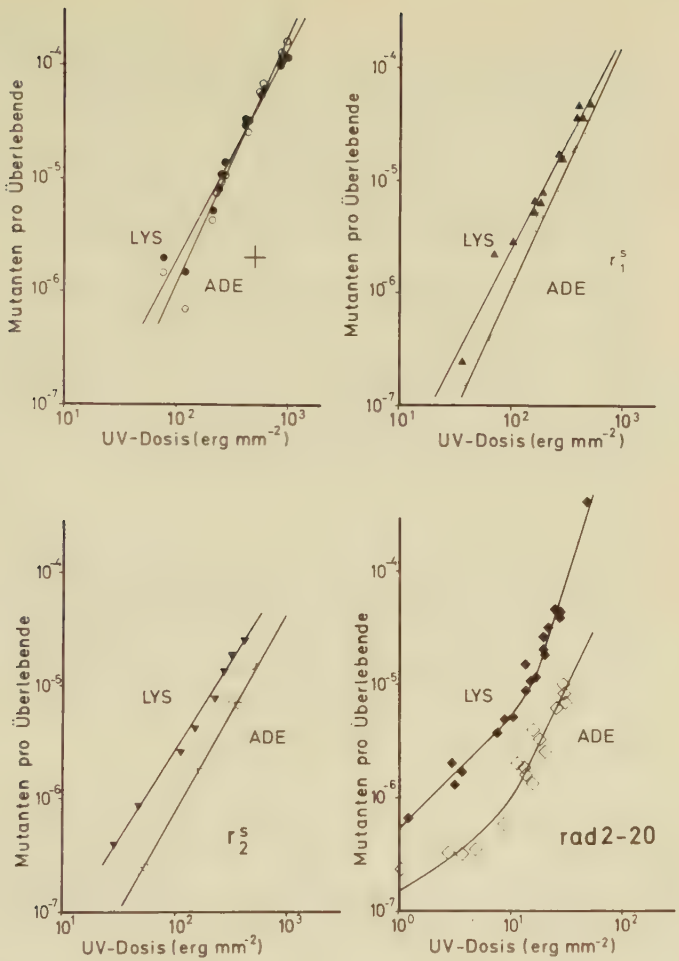


Abb. 24 bis 27:

Abhängigkeit der UV-induzierten ADENIN- und LYSIN-Mutationsraten von der Dosis bei dem Wildtyp (+) und den sensiblen Mutanten (r_1^s, r_2^s, rad2-20) bei GM-Anzucht (doppeltlogarithmische Auftragung).
Die ausgefüllten Symbole bezeichnen die LYSIN-Mutanten, die hohlen Symbole die ADENIN-Mutanten.
Jedes Symbol bezeichnet einen experimentell ermittelten Wert.
Die Ausgleichsgeraden für den Wildtyp, die r_1^s und r_2^s Mutante sind berechnet, die Ausgleichskurven für die rad2-20 Mutante nach Augenmaß eingezeichnet.

- Bei allen Stämmen führt eine Verbesserung der Atmungsfähigkeit nach GM-Anzucht zu einer Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach UV-Bestrahlung.

- Bei allen Stämmen wirkt sich GM-Anzucht auf die Schulterbildung aus; sogar in dem Excision Repair defekten Stamm (rad2-20) zeigt die DEK bei GM-Anzucht eine kleine Schulter.

- Besonders auffällig ist die Veränderung des Kurvenverlaufs des r_1^s Stammes. Während bei der VM-DEK und noch viel stärker ausgeprägt bei den atmungsdefekten Stämmen eine "Schulter-Bauch-Schwanz"-Kurve die dosisabhängige UV-Sensibilität charakterisiert, findet sich bei einer GM-Population eine gut ausgeprägte Schulter, gefolgt von einem exponentiellen Abfall.

- Ein Vergleich der $DRF_{1\%\,ü}$ der VM- und GM-Population zeigt, daß bei dem r_1^s Stamm eine besonders starke Beeinflussung der Reparaturkapazität durch den Energiehaushalt besteht. Während bei den anderen Stämmen die relative Reparaturfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert wird, tritt bei dem r_1^s Stamm bei GM-Anzucht eine Verbesserung um ca. 30% ein; der $DRF_{1\%\,ü}$ wird von 3, 14 auf 2, 3 reduziert.

Trägt man die LD_{37} (Die LD_{37} ist die Letal-Dosis, die 37% Überlebenschance gewährt und bei der [laut Treffertheorie] im Mittel ein letaler Treffer pro Zelle induziert wird) der Anzuchten mit verschiedenem Gehalt an atmungsdefekten Zellen über dem Prozentsatz der Atmungsdefizienz auf (Abb. 28), erhält man für jeden Stamm einen linearen Zusammenhang von Reparaturkapazität und Atmungsdefizienz der Population.

Eine besonders starke Beeinträchtigung der Reparatureffektivität durch die Atmungsdefizienz findet sich bei dem r_1^s Stamm und dem Wildtyp.

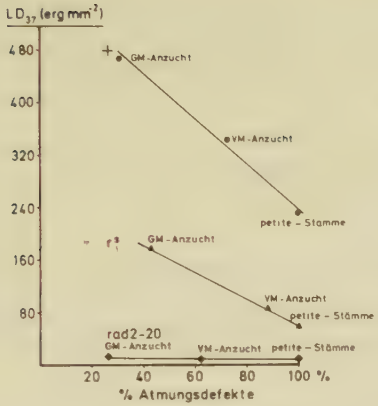


Abb. 28:

Abhängigkeit der Sensibilität des Wildtyps und der r_1^s und rad2-20 Mutante von dem Grad der Atmungsdefizienz. Die Sensibilität wird durch die LD_{37} gekennzeichnet, der Grad der Atmungsdefizienz durch den Anteil an atmungsdefekten Zellen in den VM- bzw. GM-Anzuchten (siehe Tabelle 4) und durch die petite-Stämme.

Diese Ergebnisse sind ein eindeutiger Hinweis auf die Energieabhängigkeit der Reparaturprozesse, die von verschiedenen Autoren (KIEFER 1969, 1971, LOCHMANN und UMLAUF 1971, SCHAARSCHMIDT 1972, SCHAARSCHMIDT et al. 1973) bereits untersucht worden sind. Sie zeigen, daß zumindest beim Wildtyp und dem r_1^s Haplonten das Energieangebot durch Gärung allein die Reparaturprozesse nicht optimal ablaufen läßt.

Erstaunlich ist das abweichende Verhalten der Diplonten mit den entsprechenden rad Genen: bei atmungsdefekten Stämmen besteht

keine Beeinflussung der Reparaturkapazität im Vergleich zu einer atmungskompetenten Zellpopulation bei VM-Anzucht (SCHAAR-SCHMIDT, pers. Mitteilung), bei einer GM-Population hingegen sind die Schultern reduziert und demzufolge die Zellpopulationen sensibler (KOWALSKI, pers. Mitteilung).
Eine Erklärung für das divergierende Verhalten ist vorläufig noch nicht gefunden.

Der Einfluß veränderter Atmungsfähigkeit auf die Mutabilität ist wesentlich schwieriger zu erkennen als der auf die Überlebensfähigkeit der Zelle, da sich sowohl stammspezifische als auch locusspezifische Unterschiede ergeben:

- Bei dem Wildtyp ist zwischen den Mutationsraten bei VM- und GM-Anzucht kein Unterschied. Die Mutationsraten der atmungsdefekten Stämme liegen bei den ADE-Raten unwesentlich unter, bei den LYS-Raten sehr wenig über den VM- und GM-Kurven.
- Bei dem r_1^s Stamm sind die ADE-Raten von VM- und GM-Population identisch, während die LYS-Rate der GM-Kultur unter der zugehörigen VM-Kurve liegt. Auch die petite-Stämme zeigen keine einheitliche Tendenz in ihren UV-induzierten Mutationsraten.
- Bei dem rad2-20 Stamm liegen die Kurven für die ADE- und LYS-Mutation der GM-Anzucht eindeutig unter den zugehörigen VM-Kurven, während die Mutationskurven der petite-Stämme ebenfalls kein einheitliches Verhalten in der Tendenz einer Mutationserhöhung zeigen, sondern im Bereich zwischen den VM- und GM-Kurven streuen.
  Eine Ausnahme bildet der 2105-15-p_1 Stamm, der außer der erhöhten spontanen LYS-Mutabilität auch eine um den Faktor 10 erhöhte UV-induzierte Mutabilität aufweist. Hier liegt der einzige Fall einer Mutatoreigenschaft eines atmungsdefekten Stammes vor.

Atmungsdefekte Stämme scheinen also im allgemeinen keinen eindeutig gerichteten Einfluß auf die UV-induzierte Mutationsrate zu haben; es werden mit der einen Ausnahme keine erheblichen Abweichungen von der VM-Anzucht gefunden.

3.6 Photoreaktivierung von letalen und mutativen Schäden

3.6.1 Problemstellung

Pyrimidindimere sind die einzigen UV-Photoprodukte, die mit biologischen Methoden nachgewiesen werden können, da nur sie dem Photoreaktivierungsenzym als Substrat dienen können. Unter Energiezufuhr durch sichtbares Licht werden die Dimere durch das Photoreaktivierungsenzym monomerisiert und somit der funktionsfähige Zustand der DNS wiederhergestellt.

Allerdings läßt sich keine absolute Sicherheit dafür geben, ob tatsächlich alle Dimere entfernt worden sind. Es ist bekannt, daß Thymindimere, Thymin-Cytosindimere und Cytosindimere unterschiedlich schnell repariert werden, und es ist nicht sicher, ob Cytosindimere nicht zum Teil in der DNS erhalten bleiben können (SETLOW und CARRIER 1966).
PATRICK (1972) konnte nachweisen, daß nach Bestrahlung mit langwelligem UV unter Sensibilisierung mit Acetophenon auch in Hefen nur Thymindimere entstehen und dennoch Photoreaktivierung nur zu 90% Erfolg hat. Die Erklärung für dieses Phänomen ist noch nicht bekannt. Vielleicht ist ein bestimmtes Isomer eines Thymindimers nicht photoreaktivierbar oder es sind die Nachbarschaftssequenzen für die Funktionsfähigkeit des PhR-Enzyms maßgeblich.
Das bedeutet also, daß selbst dann, wenn durch Verlängerung der Behandlungszeit mit sichtbarem Licht keine weitere Veränderung der biologischen Wirkung eintritt, keine Sicherheit dafür besteht, daß

tatsächlich alle Dimere beseitigt sind. Die Annahme scheint jedoch berechtigt zu sein, daß der überwiegende Teil entfernt wird.

Die Nachbehandlung der bestrahlten Zellen mit photoreaktivierendem Licht im biologischen Versuch kann also nur relative Aussagen machen über den Anteil an Pyrimidindimeren an letalen und mutativen Schäden in einem Stamm. Es ist auf diese Weise jedoch festzustellen, ob Pyrimidindimere als mutationsauslösende Schäden überhaupt in Frage kommen.

3.6.2 Methodisches

Die Photoreaktivierung wurde durchgeführt wie in 2.3.2 angegeben. Vorversuche hatten gezeigt, daß 45min Belichtung einer dünnen Suspension, 60 min bei einer Suspension mit hohem Zelltiter bei den verwendeten UV-Dosen für alle Stämme ausreicht, um annähernd maximale Photoreaktivierung zu erhalten. Bei längeren Behandlungszeiten begannen die unbestrahlten Kontrollen abzusterben; unter den angegebenen Bedingungen trat bei dem sensibelsten Stamm nur eine maximal 20%ige Abtötung ein. Es wurden jeweils für die unbestrahlten Kontrollsuspension und die bestrahlte Suspension die Überlebenswahrscheinlichkeit und die Mutationsraten nach PhR bestimmt. Bei der Berechnung wurde die Abtötung der Kontrolle durch die PhR einbezogen.

3.6.3 Experimentelle Ergebnisse

In den Abbildungen 29 bis 32 sind für alle Stämme die Überlebenswahrscheinlichkeiten und die ADE- bzw. LYS-Mutationsraten logarithmisch über der UV-Dosis aufgetragen. In jeder Graphik sind jeweils die Werte nach PhR im Vergleich zu den Kurven ohne PhR aufgetragen, die aus den Abbildungen 2, 6 und 7 übernommen wurden.

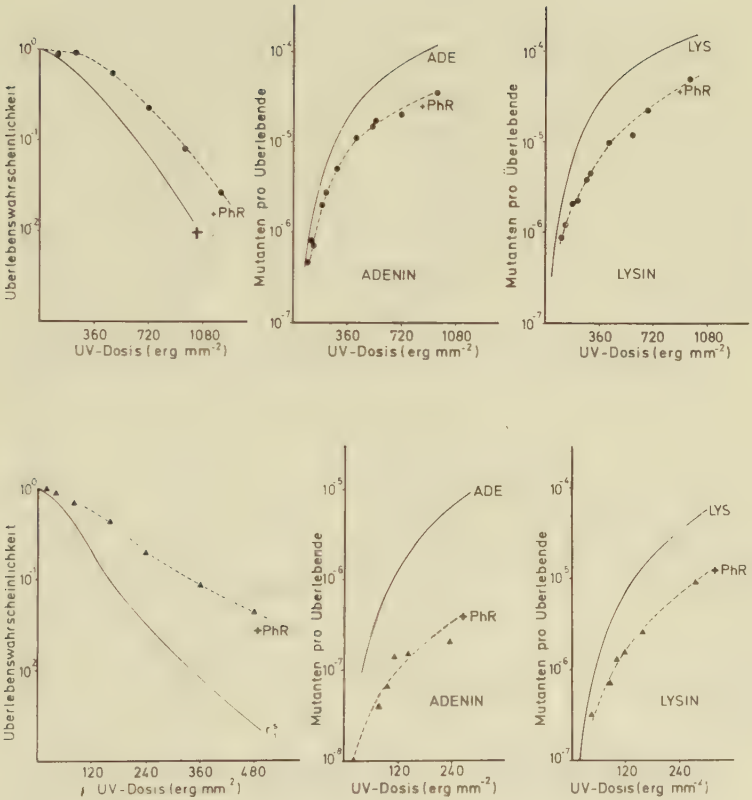


Abb. 29 und 30:

Einfluß von Photoreaktivierung auf das Überleben und die ADENIN- und LYSIN-Mutationsrate in Abhängigkeit vonder UV-Dosis bei dem Wildtyp (+) und der r_1^s Mutante.

Die Werte sind in 2 Versuchen bestimmt worden.
Die Symbole der DEK kennzeichnen Mittelwerte, die Symbole der Mutationskurven je einen experimentell bestimmten Einzelwert.
Die DEK ohne PhR sind aus Abb. 2, die Mutationskurven ohne PhR aus Abb. 6 und 7 übernommen.

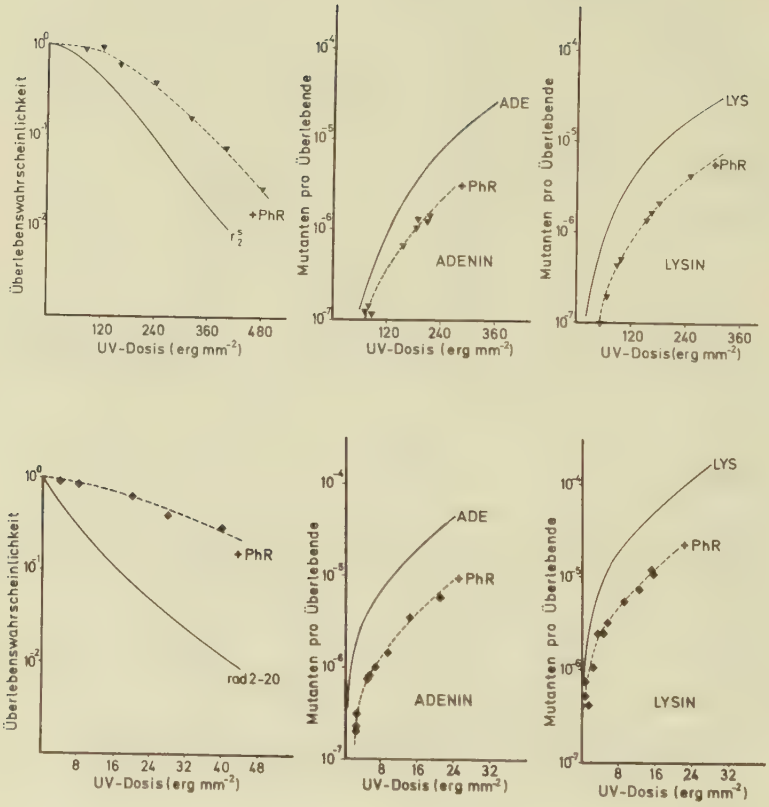


Abb. 31 und 32:

Einfluß von Photoreaktivierung auf das Überleben und die ADENIN- und LYSIN-Mutationsrate in Abhängigkeit von der UV-Dosis bei den sensiblen Mutanten r_2^s und rad2-20.

Die Werte sind in zwei Versuchen bestimmt worden.
Die Symbole der DEK kennzeichnen Mittelwerte, die Symbole der Mutationskurven je einen experimentell bestimmten Einzelwert.
Die DEK ohne PhR sind aus Abb. 2, die Mutationskurven ohne PhR aus Abb. 6 und 7 übernommen.

Aus den Graphiken ist zu ersehen:

- Photoreaktivierung hat bei allen Stämmen Einfluß, und zwar sowohl auf die Überlebenden als auch auf die Mutationsraten. Generell erhöht sich nach PhR die Überlebenschance und sinkt die Mutationswahrscheinlichkeit, d.h. durch Reparatur werden sowohl letale als auch mutative Schäden entfernt.
  Die PhR mutativer Schäden kann als weiterer Hinweis dafür gewertet werden (siehe 3.2.2), daß durch UV-Bestrahlung tatsächlich mutative Schäden entstehen und demzufolge Mutanten induziert werden.

- Die Dosis-Modifikations-Faktoren (DMF, definiert als das Verhältnis der Dosis mit PhR zu der Dosis ohne PhR bei gleichem Überlebensniveau) für unterschiedliche Überlebensbereiche zeigen für den Wildtyp und den r_1^s bzw. r_2^s Stamm keine wesentliche Abhängigkeit von der Dosis, was als Hinweis dafür gewertet werden kann, daß sich das Verhältnis von photoreaktivierbaren Pyrimidindimeren zu nicht photoreaktivierbaren Schäden in dem betreffenden Dosisbereich nicht wesentlich ändert.
  Dies trifft nicht für den rad2-20 Stamm zu, der bei 70% ü einen DMF von 9, bei 20% ü einen DMF von 4, 15 zeigt. Allerdings kann man daraus nicht eindeutig schließen, ob das Verhältnis von Dimeren zu Nichtdimeren dosisabhängig ist in den niedrigen Dosisbereichen, in denen der rad2-20 Stamm bestrahlt wird, oder ob in diesem Stamm vielleicht ein Reparatursystem dosisabhängig arbeitet.

- Bei allen Stämmen wird nach PhR nicht das Kontrollniveau von 100% Überlebenden erreicht, und auch die Mutationsrate geht nach PhR nicht auf den Anteil der spontanen Mutanten in der Population zurück. Bei Hefen scheinen nur ca. 60 bis 70% der le-

talen und mutativen Schäden auf Dimere zurückzugehen. Im Gegensatz dazu machen in Bakterien Pyrimidindimere fast 100% der letalen und ca.90% der mutativen Schäden aus (BRIDGES und MUNSON 1968, WITKIN 1966 a,b).

- Der Vergleich der Photoreaktivierbarkeit von letalen und mutativen Schäden eines Stammes bzw. der Stämme untereinander ist durch den Vergleich der DMF für Überlebende ($DMF_{ü}$) und die ADE- bzw. LYS-Mutationsraten (DMF_{ADE} bzw. DMF_{LYS}) möglich. Als Bezugsgröße wird für jeden Stamm die LD_{37} gewählt.

  In Tabelle 5 sind die jeweiligen DMF aufgeführt.

Tabelle 5: Vergleich des Einflusses der Photoreaktivierung auf Überleben, ADENIN- und LYSIN-Mutationsrate anhand der Dosis-Modifikations-Faktoren

Stamm	Gensymbol	$DMF_{ü}$	DMF_{LYS}	DMF_{ADE}
235-11c	+	1,64	1,90	1,75
2110-222	r^s_1	2,00	1,95	
2121-140	r^s_2	1,75	1,95	1,50
2105-15	rad2-20	5,05	2,65	2,95

In jedem Fall ist das Ausmaß der PhR bei dem rad2-20 Stamm am größten. Das kann dadurch erklärt werden, daß die Kurve nach Bestrahlung ohne PhR auch ohne Excision Repair zustande kommt. Hingegen spielt bei den anderen Stämmen der Anteil der Dunkelreparatur eine Rolle, da durch diese ebenfalls Pyrimidindimere beseitigt werden.

- Vergleicht man jeweils bei einem Stamm den $DMF_{ü}$ mit dem DMF_{LYS} und DMF_{ADE}, so sind diese bei dem Wildtyp und dem

r_1^s und r_2^s Stamm annähernd gleich.
Im rad2-20 Stamm hingegen ist der $DMF_ü$ ca. 1,7 bis 1,9fach so groß wie die DMF für Mutation.

Deutlicher kann man das unterschiedliche Verhalten der Stämme aus der Graphik sehen, bei der die LYS-Rate doppeltlogarithmisch über den Überlebenden aufgetragen ist, und zwar jeweils mit und ohne PhR zum Vergleich (Abb. 33).
Im Falle einer PhR, die letale und mutative Schäden in gleichem Maße entfernt, müßten die Kurven mit und ohne PhR zur Deckung kommen, was jedoch nur bei hohen Überlebensraten der Fall ist.

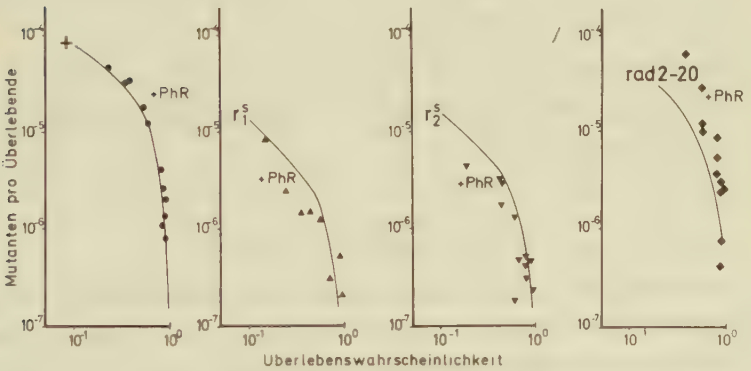


Abb. 33:

Zusammenhang zwischen UV-induzierter LYSIN-Mutationsrate und UV-bedingter Überlebenswahrscheinlichkeit mit und ohne Photoreaktivierung für den Wildtyp (+) und die sensiblen Mutanten (r_1^s, r_2^s, rad2-20), [doppeltlogarithmische Auftragung].

Bei dem Wildtyp, dem r_1^s und r_2^s Stamm liegen die Mutationskurven nach PhR z.T. auf, z.T. unter den entsprechenden Kurven ohne PhR, bei dem rad2-20 Stamm jedoch eindeutig über der Kurve ohne PhR. Offenbar werden im ersten Fall mehr mutative, im anderen Fall mehr letale Schäden durch das Photoreaktivierungsenzym entfernt. Man kann dieses Ergebnis auch so interpretieren, daß im Falle des Wildtyps und der mittelsensiblen Stämme der Anteil der photoreaktivierbaren Schäden bei den mutativen größer ist als bei den letalen Schäden, bzw. im rad2-20 Stamm kleiner.

Hiermit ist deutlich die Grenze strahlenbiologischer Aussagefähigkeit aufgezeigt. Es ist nicht zu klären, ob das unterschiedliche Verhalten der Stämme durch unterschiedliche Primärschäden verursacht ist, durch unterschiedliche Dosisabhängigkeit verschiedener UV-Bestrahlungsprodukte bedingt wird oder in der unterschiedlichen Reparaturfähigkeit zu suchen ist.

Eine eindeutige Aussage ist nur darüber zu machen, daß auch bei Hefen Pyrimidindimere einen Teil der letalen und mutativen Schäden ausmachen.

3.7 Einfluß der rad Gene auf die spontane Mutation

Neuere Experimente erbringen immer mehr Argumente für die Annahme, daß die spontane Mutabilität weniger durch Umwelteinflüsse (z.B. Höhenstrahlung, radioaktive Strahlung, Einfluß des Erdmagnetfeldes usw.) oder physikochemisch bedingte Änderung der DNS (z.B. wäre Änderung der Paarungseigenschaft durch Tautomerie der Nukleotidbasen denkbar) als durch zelleigene "Faktoren", vorwiegend enzymatische Abläufe an der DNS : Replikation, Reparatur, Rekombination verursacht wird.
Mutabilität selbst ist also offenbar als phänotypisches Merkmal der genetischen Kontrolle unterworfen (v. BORSTEL et al. 1971).

Es liegt daher nahe, den Einfluß der rad Gene auf die spontane Mutationsrate zu untersuchen, und zwar besonders unter dem Gesichtspunkt, weitere Merkmale kennenzulernen, die durch das bisher noch nicht identifizierte r^s_1 bzw. r^s_2 Gen beeinflußt werden.

3.7.1 Vergleich der Zahl der prototrophen Mutanten in den unbestrahlten Kontrollen

Eine exakte Aussage über die spontane Mutationsrate kann man nur mit Hilfe des Fluktuationstests (LURIA und DELBRÜCK 1943) machen, da dieser es zuläßt, die Häufigkeit der spontanen Mutationsereignisse zu bestimmen.

Nach STEVENS (1942) und LEA und COULSON (1949) sollte jedoch auch die Zahl der prototrophen Mutanten, die sich in einer Zellpopulation bestimmter Größe angehäuft haben, ein Maß für die spontane Mutationsrate, d.h. die tatsächlich stattgefundenen Mutationsereignisse sein, und von vielen Autoren werden diese Werte auch als "spontane Mutationsrate" angegeben.

Die Tabelle 6 gibt für alle Stämme für jeweils beide Bedürftigkeiten den Anteil der spontanen Mutanten/10^7 Zellen aus den unbestrahlten Kontrollplattierungen einiger Bestrahlungsexperimente an, und zwar für VM- und GM-angezüchtete Populationen und für einige atmungsdefekte Stämme.
In Abb. 32 sind die gemittelten Werte graphisch dargestellt.

Da der Anteil der spontanen Mutanten von Suspension zu Suspension naturgemäß unterschiedlich ist, ergeben sich z.T. innerhalb einer Zahlenspalte ziemliche Unterschiede.

Tabelle 6:

Zahl der spontanen Mutanten/ 10^7 Zellen bei unterschiedlich atmungsfähigen Zellpopulationen

Stamm Gensymbol	ADE-Revertanten/ 10^7			LYS-Revertanten/ 10^7		
	petite-Stämme	VM-Anzucht	GM-Anzucht	petite-Stämme	VM-Anzucht	GM-Anzucht
235-11c	6,25	3,18		13,70	8,26	
+	0,47	4,14	5,13	10,20	6,90	5,82
		1,12	3,60		3,07	5,60
			5,70			5,65
		1,75			4,96	
Mittel:	3,36	2,50	4,98	11,95	5,80	5,36
2110-222	6,18	1,55		32,90	12,40	
r^s_1	4,04	0,86	0,65	33,60	6,90	13,30
	5,00	8,90	4,60	28,60	17,00	12,90
	3,60		2,18		35,90	9,97
Mittel:	4,71	3,77	2,48	31,70	18,10	12,00
2121-140		2,07			4,67	
r^s_2		1,28	0,97		4,80	5,18
		0,70	1,70		4,90	3,40
		0,69			2,40	
Mittel:		1,85	1,35		4,19	4,29
2105-15	19,20	13,60	4,33	33,40	29,70	8,66
rad2-20	17,80		4,67	44,40		15,00
	19,90	33,20	1,50	165,00	39,60	22,60
	24,00	49,50	3,37	35,40	75,00	2,10
Mittel:	20,20	32,10	3,47	69,50	48,20	12,09

Der Anteil an atmungsdefekten Zellen bei den einzelnen Populationstypen kann aus Tabelle 5 in Kap. 3.5 entnommen werden. Die Werte für VM- und GM-Anzucht, die in einer Zeile nebeneinander stehen, stammen aus einem Versuch. Das bedeutet, daß die Vorkulturplatten, aus denen die jeweilige Suspension gewonnen wurde, mit jeweils der gleichen Menge Suspension aus derselben Vorkultur I angeimpft wurden.

Dennoch läßt sich aus der Tabelle folgendes ersehen:

- Bei allen Stämmen und allen hinsichtlich der Atmungsfähigkeit unterschiedlichen Populationstypen ist ausnahmslos die Zahl der ADE-Revertanten kleiner als die Zahl der LYS-Revertanten in der Population.

  Dieses Ergebnis entspricht der bei den Bestrahlungsexperimenten festgestellten Tendenz, daß die UV-Induktionschance für ADE-Revertanten kleiner ist als für LYS-Revertanten.

- In allen Stämmen (bis auf den r_2^s Stamm) zeigt sich eine Abhängigkeit der Mutantenhäufigkeit vom Grad der Atmungskompetenz der Zellpopulation und zwar nimmt der Anteil an Mutanten mit zunehmender Atmungsfähigkeit ab, siehe dazu auch Abb. 34.

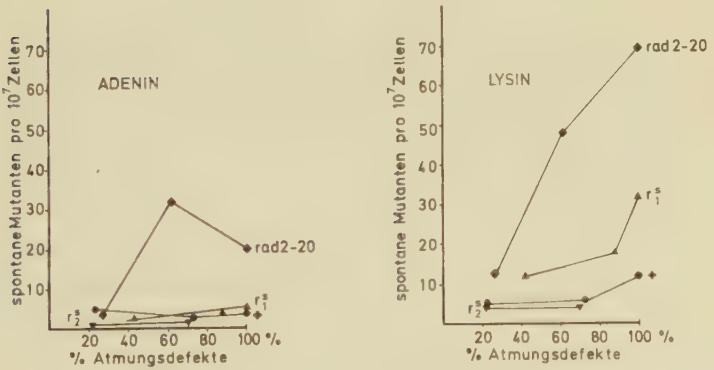


Abb. 34:

Häufigkeit spontaner ADENIN- und LYSINmutanten in Zellpopulationen mit unterschiedlichen Anteilen an atmungsdefekten Zellen beim Wildtyp und den sensiblen Mutanten (r_1^s, r_2^s, rad2-20).
Die Mutantenhäufigkeiten sind in den VM- und GM-Anzuchten bzw. bei den petite-Stämmen mit dem entsprechenden rad Gen bestimmt worden.
Der Anteil der atmungsdefekten Zellen der Populationen ist aus Tabelle 5 entnommen.

Besonders deutlich ist dieser Effekt zu erkennen, wenn man die Häufigkeit an Prototrophen in einer VM- und einer GM-Population vergleicht, die aus einer Vorkultur angezüchtet wurden. Bei der GM-Population findet sich immer der geringere Anteil an Mutanten.
Den größten Einfluß der Atmungsfähigkeit auf die spontane Mutationsrate findet man bei dem rad2-20 Stamm.

- Aus der Tabelle 6 und der Abb. 34 geht ebenfalls hervor, daß zumindest bei der LYS-Reversion eine Abhängigkeit der Höhe der Rate vom Reparaturvermögen des Stammes besteht, und zwar auch wenn man im Bereich niedriger Atmungsdefizienz vergleicht, um die Beeinflussung durch den energetischen Faktor möglichst auszuschalten.
Die Mutantenhäufigkeit steigt mit wachsender Sensibilität, eine Ausnahme macht jedoch der $r^{s}_{?}$ Stamm, der sich wie der Wildtyp verhält, bzw. sogar weniger ADE-Revertanten hervorbringt.

Bereits mit dieser recht groben Vergleichsmethode ist ersichtlich, daß der physiologische und genetische Zustand der Zelle einen erheblichen Einfluß auf die Mutabilität hat, und zwar sind zwei Faktoren bedeutsam:
einerseits das Reparaturvermögen und andererseits der Energiehaushalt der Zelle. Dabei liegt die Vermutung nahe, daß der Energiehaushalt die Reparaturfähigkeit beeinflußt, was sich wiederum auf die Korrektheit des Replikationsvorganges auswirkt.

3.7.2 Bestimmung der spontanen Rate zur ADENIN-Prototrophie mit Hilfe des Fluktuationstests

Um eine genauere Aussage über den Zusammenhang von spontaner Mutabilität und Reparaturfähigkeit machen zu können, wurde die spon-

tane Mutationsrate zur ADE-Prototrophie mit Hilfe des Fluktuationstests bestimmt.

Um den Einfluß der Atmungsdefizienz möglichst auszuschalten, erschien eine Untersuchung von GM-Populationen besonders günstig. Da die Zellen in flüssigem GM-Medium jedoch sehr schlecht wuchsen und die merkwürdigsten Anormalitäten auftraten, wurde der Test schließlich in flüssigem VM durchgeführt, wie in Material und Methoden angegeben ist.

Die Ergebnisse, aus jeweils 6 bis 8 Parallelversuchen gemittelt, sind in Tabelle 7 zu sehen. Mit Hilfe des T-Tests wurde errechnet, ob die Unterschiede der Raten der sensiblen Stämme zu der Rate des Wildtyps signifikant sind.

Tabelle 7: Spontane ADENIN-Mutationsraten des Wildtyps und der sensiblen Mutanten

Stamm	Gensymbol	atmungsdefekte Zellen (%)	spontane ADE-Rate mit Standardabweichung s	
235-11c	+	67,3	$(0,99 \pm 0.083) \times 10^{-7}$	
2110-222	r_1^s	79,8	$(1,6 \pm 0,22) \times 10^{-7}$	$p \leq 0,05$
2121-140	r_2^s	66,2	$(1,3 \pm 0,11) \times 10^{-7}$	$p \leq 0,05$
2105-15	rad2-20	45,8	$(2,3 \pm 0,23) \times 10^{-7}$	$p \leq 0,01$

Im Unterschied zu den Testwerten in Tabelle 6 zeigt auch der r_2^s Stamm eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Rate.

Alle drei strahlensensiblen Stämme haben also im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant, wenn auch nur um den Faktor 1,3 bis 2,3, erhöhte spontane ADE-Mutationsrate.

3.8 UV-Induktion von atmungsdefekten Mutanten

Atmungsdefekte Zellen teilen sich unter aeroben Bedingungen langsamer als atmungskompetente Zellen und bilden deshalb häufig kleinere und in der Färbung veränderte Kolonien. Gegenüber normalen Saccharomyces-Zellen zeigen sie immer eine stark erhöhte Gärung und , je nach Mutante, eine unterschiedlich stark oder völlig reduzierte Atmung (KRAEPELIN 1967). Dennoch werden sie generell als "Atmungsdefekte" bezeichnet, selbst wenn sie noch geringe Fähigkeiten zur Atmung besitzen sollten.

Der Atmungsdefekt äußert sich biochemisch durch den Verlust verschiedener Cytochrome, die in der Atmungskette gebraucht werden (EPHRUSSI 1953, SHERMAN und SLONIMSKI 1964) und phänotypisch durch die Unfähigkeit, mit nicht zu vergärenden Energiequellen, wie z.B. Glycerin, Laktat oder Alkohol zu wachsen.

Die Atmungsdefizienz kann durch chromosomale Mutation entstehen (gemäß Yeast Genetics Supplement to Microbial Genetics Bulletin, No. 31, November 1969 sind 9 Gene bekannt, deren Veränderung Atmungsdefizienz bewirkt) oder durch die Veränderung eines cytoplasmatischen Faktors ς (EPHRUSSI 1953), der inzwischen als mitochondriale DNS identifiziert werden konnte.
Atmungsdefekte Mutanten werden im Vergleich zu anderen (Kern-) Mutanten in hoher Rate durch UV-Bestrahlung induziert (RAUT und SIMPSON 1955), wobei zum überwiegenden Teil cytoplasmatische Mutanten (ς^- oder rho$^-$ bezeichnet) entstehen (ZAKHAROV et al. 1970).

Damit stellt sich die Frage, inwieweit Reparaturenzyme, die an der Beseitigung bzw. Veränderung UV-induzierter Schäden der Kern-DNS beteiligt sind, auch für die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien-DNS Sorge tragen.

Wie MOUSTACCHI (1971) darstellt, lassen sich verschiedene Möglichkeiten der Interaktion zwischen der Reparatur an Kern- und Mitochondrien-DNS vorstellen und bei verschiedenen rad Stämmen auch experimentell nachweisen. So bietet sich die Untersuchung des Einflusses der rad Gene auf die Induktion atmungsdefekter Mutanten als eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der sensiblen Stämme an.

Es wurden der Wildtyp, der r_1^s und rad2-20 Stamm untersucht; der r_2^s Stamm verhielt sich in orientierenden Versuchen wie der r_1^s Stamm.

3.8.1 Methodisches zur Bestimmung der Mutationsraten zur Atmungsdefizienz

Die Bestimmung der Induktion atmungsdefekter Mutanten erforderte keine zusätzlichen Versuche, da bei den üblichen Bestrahlungsexperimenten in einigen Versuchen die Suspension außer auf MM auch auf GM+G ausplattiert wurden. Weil auf GM+G die atmungskompetenten Zellen große Kolonien, die atmungsdefekten winzige Kolonien bilden, kann auf diese Weise der Anteil der atmungsdefekten Zellen in unbestrahlten und bestrahlten Populationen leicht festgestellt werden.
Um den hohen spontanen Anteil an atmungsdefekten Zellen möglichst niedrig zu halten, wurden nur auf GM angezüchtete Kulturen untersucht.

Zur Berechnung der induzierten Rate atmungsdefekter Mutanten wurde die in 2.6.2 angegebene Formel zugrundegelegt, jedoch in veränderter Form.
Bei der Aufstellung jener Formel konnte die berechtigte (und in 3.2.2

bzw. Abb. 5 experimentell belegte) Annahme gemacht werden, daß die in der Ausgangssuspension bereits vorhandenen Mutanten bei Bestrahlung nicht selektiv abgetötet oder angereichert werden. Die Graphiken 21 bis 23 zeigen jedoch, daß diese Annahme nicht für atmungsdefekte Mutanten gilt. Die Atmungsfähigkeit beeinflußt in einer unterschiedlichen stammspezifischen Weise die Reparaturfähigkeit einer Zelle, denn die wahllos herausgepickten atmungsdefekten Stämme zeigen eine deutlich höhere Sensibilität gegen UV-Bestrahlung als eine GM-Population.

Dieser Unterschied kann nicht vernachlässigt werden, so daß sich die UV-induzierte Rate atmungsdefekter Mutanten ($m_{\varsigma -}$) berechnet gemäß:

$$m_{\varsigma -} = \frac{N}{\ddot{u} \cdot Z_o} - \frac{\ddot{u}_{\varsigma -} \cdot N_o}{\ddot{u} \cdot Z_o}$$

mit

- N Zahl der Atmungsdefekten nach Bestrahlung mit der Dosis D
- N_o Zahl der Atmungsdefekten der Ausgangssuspension
- Z_o Zahl der teilungsfähigen Zellen der Ausgangssuspension
- $\ddot{u}$ Überlebenschance einer GM-Population bei der Dosis D
- $\ddot{u}_{\varsigma -}$ Überlebenschance der Atmungsdefekten bei der Dosis D

Das bedeutet, daß bei jeder Dosis außer der Überlebenschance der Gesamtpopulation die der atmungsdefekten Mutanten der Suspension bestimmt werden müßte.

Da dies einen umfangreichen experimentellen Aufwand bedeutet hätte, wurden zwei vereinfachende Annahmen gemacht:

1. Stellvertretend für alle atmungsdefekten Mutanten eines Stammes wurden die in den Abb. 21-23 in ihrer UV-Sensibilität bereits charakterisierten petite-Stämme angesehen.
2. Die im Vergleich zu der GM-Kultur erhöhte Sensibilität wurde durch den $DRF_{1\%}$ zwischen GM-Population und den petite-Stämmen bestimmt.
   D.h. statt mit dem Wert ü $_{g}$ - wurde mit dem Wert $ü/DRF_{1\%}$ gerechnet. Dabei wurde außer Acht gelassen, daß der DRF selber dosisabhängig ist. Ebenso wurde ein Fehler vernachlässigt, der sich aus dieser Dosisabhängigkeit ergibt: der DRF, auf das ü des resistenteren Stammes bei der Dosis D bezogen, entspricht nicht ganz genau dem Verhältnis der Überlebenden des resistenten und des sensiblen Stammes bei dieser Dosis D.

3.8.2 Experimentelle Ergebnisse

Die auf diese Weise berechneten Mutationsraten sind in Abb. 35 in Abhängigkeit von der applizierten Dosis aufgezeichnet, und zwar in Gegensatz zu den nuklearen Mutationen in doppeltlinearem Maßstab. Die gestrichelt gezeichneten Kurven ergeben sich, wenn man die selektive Abtötung der atmungsdefekten Mutanten nicht einbezieht.

Aus der Graphik ist folgendes zu entnehmen:

- Alle Stämme zeigen keine linearen, sondern eine parabelartige Dosisabhängigkeit der Induktion atmungsdefekter Mutanten. Bei dem r_1^s Stamm und dem Wildtyp wird bei höheren Dosen (480 erg mm^{-2} bzw. 960 erg mm^{-2}) eine Induktionssättigung erreicht.

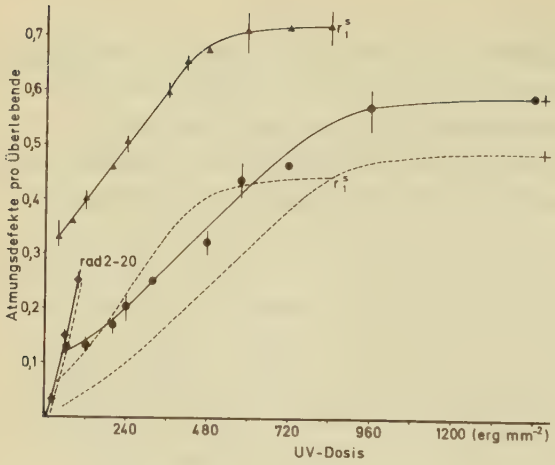


Abb. 35:

UV-induzierte Mutationsrate zur Atmungsdefizienz in Abhängigkeit von der UV-Dosis bei dem Wildtyp und der r_1^s und rad2-20 Mutante.
Die Symbole kennzeichnen die Induktionswerte, die unter Einbeziehung der selektiven Abtötung der atmungsdefekten Zellen berechnet werden.
Die gestrichelten Kurven lassen die selektive Abtötung unberücksichtigt.
Die Werte sind aus 5 bis 8 Versuchen gemittelt.

- Die drei Stämme unterscheiden sind in der Steigung der Kurven und in deren Lage im Koordinatensystem zueinander:
  Der Wildtyp zeigt die geringste Zunahme an Mutanten pro Dosiseinheit, jedoch eine relativ hohe spontane Mutation zur Atmungsdefizienz, die sich der induzierten überlagert. Es mutieren ca. 10% der Zellen spontan.
  Der rad2-20 Stamm zeigt bis zu 40 erg mm^{-2} so gut wie keine Induktion, weist jedoch danach die steilste Zunahme an atmungsdefekten Mutanten pro Dosiseinheit auf (die 4, 7fache Zunahme

der Wildtyprate), so daß er bei 10 erg mm^{-2} den doppelten Anteil im Vergleich zum Wildtyp hat.

Der r_1^s Stamm zeigt die 1,5fache Steigerung in der Zunahme an Atmungsdefekten/Dosiseinheit im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch liegt die Kurve aufgrund eines hohen Spontanenanteils so hoch über dem Wildtyp, daß , bei gleicher Dosis verglichen der 2,5 fache Anteil an atmungsdefekten Mutanten/Überlebende in der Zellpopulation zu finden ist.

Offenbar äußert sich der Einfluß der rad Gene auf die Mutation zur Atmungsdefizienz in doppelter Weise:

1. Aus der unterschiedlichen Lage der Kurven im Koordinatensystem ergibt sich ein Hinweis darauf, daß sich der UV-Induktion von Mutanten eine sehr hohe spontane Produktion überlagert, die in den verschiedenen Stämmen unterschiedlich beeinflußt wird: offenbar wirkt das rad2-20 Gen reduzierend, das r_1^s Gen fördernd auf die im Wildtyp relativ umfangreiche spontane Mutation zur Atmungsdefizienz.

   Während man bei der Mutation zur Prototrophie die spontane Mutation der Auxotrophen vernachlässigen konnte (HAEFNER 1965), scheint sie bei der Mutation zur Atmungsdefizienz Einfluß zu haben.
2. Aus dem unterschiedlichen Anstieg der Kurven über der Dosis ergibt sich jedoch auch ein Einfluß der rad Gene auf den Prozeß, der bei der UV-Induktion eine Rolle spielt.

Das bedeutet also, daß die Aufgabe der Reparatursysteme nicht nur darin besteht, Schädigungen der Kern-DNS zu entfernen, sondern auch die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien-DNS aufrechtzuerhalten. Wie die chromosomalen Mutationen scheinen auch die Atmungsdefizienz-Mutationen sowohl bei spontaner als auch bei der UV-induzierten Entstehung durch die rad Gene beeinflußt zu sein.

4. DISKUSSION

Die Untersuchung der Strahlensensibilität verursachenden Gene in ihrem Einfluß auf die Koloniebildungsfähigkeit nach UV-Bestrahlung, auf die spontane und UV-induzierte Mutation von der Auxotrophie zur Prototrophie und auf die UV-Induktion von atmungsdefekten Mutanten war zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen durchgeführt worden:

1. Es sollte überprüft werden, ob die Sensibilität der rad Stämme auf die Störung eines Enzyms, das Schäden in der DNS repariert, zurückzuführen ist.
2. Es sollten Aussagen darüber gemacht werden, in welches Reparatursystem das R^s_1 und R^s_2 Genprodukt einzuordnen sind.
3. Es sollten weitere Hinweise auf den molekularen Ablauf des durch UV-Schäden ausgelösten Mutationsprozesses bei Hefen gefunden werden.

Ein grundliegendes Problem der Strahlenbiologie und somit auch bei der Bearbeitung der genannten Fragestellungen ist folgendes:

Die Zuordnung von dem experimentell zu erfassenden biologischen Effekt zu den diesem Effekt zugrundeliegenden molekularen Abläufen ist schwierig und nur mit indirekten Methoden erfaßbar.
Es ist nicht möglich, die biologische Wirkung, die durch einen definierten Schaden an definierter Stelle des Genoms ausgelöst wird, in einer einzigen Zelle zu untersuchen, sondern bei Bestrahlung entstehen in einer Zellpopulation eine Anzahl von verschiedenen UV-Photoprodukten, die - bei geeigneter Methodik - einigermaßen statistisch über die Genome aller Zellen verteilt sind.

Wenn man den Einfluß der Strahlen auf physiologische Prozesse, wie z.B. RNS- und Proteinsynthese untersucht, erfaßt man die Ge-

samtproduktion unterschiedlich geschädigter Zellen. Bei der Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit erfaßt man die Nachkommen der Zellen, die mit den Schäden fertiggeworden sind oder gar keine Schädigung hatten, und gerade die geschädigten, die die letalen Schäden erhielten, nicht. Nur bei der Untersuchung von Mutanten und Rekombinanten werden die Nachkommen vorwiegend der Zellen erfaßt, für deren genetische Veränderung die Strahleneinwirkung Ursache war. Wenn auch der molekulare Prozess, der schließlich eine Mutation bzw. Rekombination zur Folge hat, nicht direkt zu erfassen ist, so ist es durch geeignete genetische Methoden immerhin möglich, den Ort der Informationsänderung im Genom zu analysieren und aus der Art der Änderung Rückschlüsse auf den Prozeß zu ziehen.

4.1 Experimentell gesicherte und hypothetische Voraussetzungen für die Interpretation der Ergebnisse

Bevor die experimentellen Ergebnisse im Rahmen eines Mutationsmodelles für Hefen diskutiert werden, erscheint es sinnvoll, die Bedingungen zu prüfen, unter denen die biologischen Effekte interpretiert werden können. Es sollte diskutiert werden, über welche molekularen Voraussetzungen Kenntnisse vorhanden sind bzw. überhaupt experimentell erworben werden können und über welche vorläufig nur Hypothesen bestehen.

Dabei erscheint wichtig:

1. Welche UV-Photoprodukte können entstehen, und wie steht es um die Kenntnis ihrer letalen und mutagenen Wirkung?
2. Wie wichtig ist die Isogenität der verschiedenen Hefestämme bei dem Vergleich der Mutationsraten?
3. Welche Modelle könnten zur Erklärung der Strahlensensibilität herangezogen werden?

4.1.1 Biologische Wirkung von UV-Photoprodukten in bestrahlten Zellen

Nachdem durch verschiedenste Versuchsanordnungen nachgewiesen worden war, daß bevorzugt Nukleinsäuren Quanten der Wellenlänge 254 nm absorbieren (zusammenfassende Darstellung HAYNES 1964), hatte die Photobiologie besonderes Interesse an der Erforschung der Schadenswirkung an der DNS.

So kennt man heute aus in vitro Versuchen eine große Zahl an Photoprodukten der DNS, weiß aber häufig nichts Genaues über deren Bedeutung bei der Bestrahlung von Zellen, denn

- Manche UV-Photoprodukte sind z.T. so instabil und werden in so kleinen Mengen gebildet, daß sie aus bestrahlten Zellen nicht oder nur sehr schlecht isolierbar sind.
- Bei verschiedenen Organismen könnten aufgrund unterschiedlicher DNS- bzw. Chromosomenstruktur verschiedene UV - Produkte gebildet werden.
- Verschiedene physiologische und physikochemische Bedingungen bei der Bestrahlung können die Bildung der verschiedenen Produkte unterschiedlich beeinflussen.
- Durch unterschiedliche Reparierbarkeit verschiedener Schadenstypen muß ein biologischer Einfluß auf die primäre Strahlenwirkung berücksichtigt werden.

Durch die Verbesserung biochemischer und physikochemischer Untersuchungsmethoden hat sich in den letzten Jahren das Interesse der Photobiologie stärker den UV-Photoprodukten der Proteine zugewandt, die entgegengesetzt früheren Ansichten durchaus bei 254 nm Absorption und chemische Reaktivität zeigen können, die von biologischem Belang sein können (SMITH und HANAWALT 1969). Man sollte daher bei der Interpretation strahlenbiologischer Experimente stärker als bisher die Möglichkeit cytoplasmatischer Reaktion auf die UV-Bestrahlung einbeziehen.

4.1.1.1 UV-Photoprodukte bei in vitro Bestrahlung der DNS

Es gibt eine große Anzahl zusammenfassender Artikel über die Entstehung und chemischen Eigenschaften der zahlreichen UV-Bestrahlungsprodukte der Nukleinsäuren (u.a. SMITH 1966, FAHR 1969, SMITH und HANAWALT 1969, VARGHESE 1972). Deshalb sollen hier nur die wichtigsten Arten genannt werden ohne näheren Kommentar.

Grundsätzlich ist die Reaktivität des Zucker-Phosphat-Rückgrats und der Purinbasen gering, hauptsächlich führt die Energieabsorption zur Reaktion der Doppelbindung zwischen dem C_5- und C_6-Atom der Pyrimidinringe:

- Pyrimidindimere entstehen durch Bildung eines Cyclobutanringes zwischen zwei benachbart gelegenen Pyrimidinen; Thymin-Thymin, Thymin-Cytosin- und Cytosin-Cytosin-Dimere besitzen unterschiedliche Bildungsgeschwindigkeit und Stabilität.
- Dihydro- und Hydratisierungsprodukte
- Addukte verschiedenster Moleküle unter Einbeziehung anderer Atome des Pyrimidinrings als des C_5- und C_6-Atoms.
- DNS-Protein-Crosslinks, Vernetzung zwischen dem C_5-Atom des Pyrimidinrings und einigen Aminosäuren, z.B. Cystein, Serin, Methionin u.a.
- DNS-DNS-Crosslinks, vermutlich durch sog. trans-anti Pyrimidindimere, die durch Bildung eines Cyclobutanringes zwischen zwei sich gegenüberstehenden Pyrimidinen entstehen können (PATRICK 1972).
- UV-induzierte Strangbrüche (SMITH 1971).

4.1.1.2 Dosisabhängigkeit der Schadensinduktion

Die Kenntnis der Dosisabhängigkeit der Schadensinduktion ist wichtig für die Interpretation der Dosisabhängigkeit der Mutationsrate. Z.B. erweist sich die Photoreaktivierbarkeit der mutativen Schäden im

rad2-20 Stamm geringer als die der letalen im Gegensatz zu allen anderen Stämmen (Kap. 3. 6. 3). Eine eindeutige Interpretation ist nicht möglich, da nicht feststellbar ist, ob in niedrigen Dosisbereichen eine andere Relation von mutativen zu letalen Schäden vorliegt als in höheren Dosisbereichen, oder ob dies ein reparaturspezifisches Verhalten ist.
Auch für die Interpretation der Mutationskinetik ist es bedeutsam zu wissen, ob für einen bestimmten Schadenstyp eine nichtproportionale Dosisabhängigkeit möglich ist, wenn unterschiedlich sensible Stämme verglichen werden sollen, die in verschiedenen Dosisbereichen bestrahlt werden.

Über die Abhängigkeit der Schäden von der UV-Dosis in der Zelle gibt es nur wenige Untersuchungen, die überwiegend in hohen und deshalb besonders für die sensiblen Stämme biologisch unrelevanten Dosisbereichen ($\geqslant 10^4$ erg mm^{-2}) durchgeführt wurden, außerdem nur für die gut isolierbaren und nachweisbaren Dimere. Eine Ausnahme bilden die neueren Arbeiten von SWINTON und HANAWALT (1973) und UNRAU et al. (1973) an drei verschiedenen Bakterienarten und an Saccharomyces cerevisiae. UNRAU et al. untersuchten auch einen Dosisbereich zwischen 1 bis 12 x 10^3 erg mm^{-2} und erfaßten damit einen Bereich, der für den strahlenresistenten Wildtyp interessant ist. Während die Bildung der Thymindimere bis 12 x 10^3 erg mm^{-2} proportional mit der Dosis zunimmt, sinkt die anfängliche Bildungsrate der Cytosinhaltigen Dimere bereits bei 2 x 10^3 erg mm^{-2} wieder ab, da sich strahlungsbedingte Bildung und Spaltung der Cytosin-haltigen Dimere überlagern. Auch bei Tetrahymena steigt die Thymindimerbildung bis 10^4 erg mm^{-2} proportional mit der Dosis (SWINTON und HANAWALT 1973).

In dem biologisch relevanten Dosisbereich bis 2 x10^3 erg mm^{-2} findet sich bei UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 254 nm

bei drei Bakterienarten und Hefe übereinstimmend ein Verhältnis von CC : CT : TT von nahezu 1:1:2 (UNRAU et al. 1973). Das bedeutet, daß Cytosindimere einen wesentlich größeren Anteil der Pyrimidindimere ausmachen als ursprünglich angenommen wurde. Aus in vitro Bestrahlungsversuchen an DNS von E. coli mit 265 nm war von SETLOW und CARRIER (1966) das Verhältnis CC : CT : TT auf 1:4:5 geschätzt worden.

4.1.1.3 Reparierbarkeit der UV-Photoprodukte

Durch biochemische Methoden eindeutig nachgewiesen ist nur die Reparatur von Pyrimidindimeren durch Photoreaktivierung (RUPERT und HARM 1966, SETLOW 1966a,b) und Excision Repair (SETLOW und CARRIER 1964, BOYCE und HOWARD-FLANDERS 1964). Für alle anderen Schadenstypen ist nur bekannt, daß sie nicht photoreaktivierbar sind - nach allen bisherigen Untersuchungen bildet das Photoreaktivierungsenzym nur mit Pyrimidindimeren einen Enzym-Substrat-Komplex. Über ihre Reparierbarkeit durch die Dunkelreparaturprozesse bestehen nur mehr oder weniger indirekte Vermutungen (SMITH und HANAWALT 1969, VARGHESE 1972), die meist aus biologischen Experimenten gewonnen wurden.

4.1.1.4 Mutagenität der UV-Photoprodukte

Eine Aussage darüber, ob ein bestimmtes UV-Photoprodukt mutationsauslösend sein kann, ist noch schwieriger zu machen als eine Aussage über die Reparierbarkeit, denn hierbei scheiden direkte biochemische Untersuchungen völlig aus. Da mutative Ereignisse noch viel seltener sind als letale, kann man den von einem UV-Schaden ausgelösten informationsändernden Prozess nicht mit biochemischen Methoden verfolgen.

Es sind also nur indirekte Methoden der Untersuchung möglich. So ist bisher aufgrund der Photoreaktivierbarkeit eindeutig nur bei Pyrimidindimeren nachgewiesen, daß sie bei Bakteriophagen, Bakterien und z.B. auch Hefen Mutationen auslösen können (MEISTRICH und DRAKE 1972, WITKIN 1966a,b, RESNICK 1968).
Da bei Photoreaktivierung jedoch die Mutationsrate (wie auch die Überlebensrate) niemals auf das Kontrollniveau zurückgeht, wird geschlossen, daß auch andere UV-Photoprodukte als Pyrimidindimere mutagen wirken können (MEISTRICH und DRAKE 1972). Direktere Beweise gibt es nicht, ggf. mit einer Ausnahme für Cytosinhydrat, das jedoch nur an Einzelstrang-DNS gebildet wird. Bei in vitro Versuchen stellten ONO et al. (1965) und GROSSMANN und RODGERS (1968) fest, daß Cytosinhydrat durch Verlust eines Protons am C_5-Atom des Pyrimidinringes die Paarungseigenschaft von Uracil annehmen kann. Gesetzt den Fall, daß die entsprechende Reaktion auch in vivo ablaufen kann, könnte dadurch eine GC → AT-Transition verursacht werden.

4.1.2 Isogenität der rad Stämme

Die Isogenität der Stämme bildet eine wichtige Voraussetzung dafür, daß das unterschiedliche Mutationsverhalten auf den Einfluß der unterschiedlich funktionsfähigen Reparatursysteme zurückgeführt werden kann. Die Isogenität muß besonders die Zahl und Struktur der Gene betreffen, deren Mutation den jeweils untersuchten Phänotyp hervorrufen kann.

1. Gleiche Zahl an mutierbaren Genen
   Dies betrifft vor allem die Suppressorgene, die bei Hefen in großer Zahl und ggf. in Redundanz vorliegen (MORTIMER und GILMORE 1968). Z.B. könnte der im Vergleich zu den anderen

Stämmen erhöhte Anteil an Suppressoren (siehe Kap. 3.4.2) unter den Revertanten bei dem rad2-20 Stamm auf eine erhöhte Zahl an Suppressorgenen zurückzuführen sein, wenn nicht die spontane Häufigkeit von Suppressormutationen (ca. 70% aller Revertanten in der unbestrahlten Kontrolle sind Suppressormutanten) bei allen untersuchten Stämmen ungefähr gleich wäre.

2. Gleiche Feinstruktur der mutierbaren Gene
Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Bildungswahrscheinlichkeit für ein Pyrimidindimer nicht überall in der DNS gleich groß ist, sondern daß die Basensequenz der benachbarten Nukleotide entscheidenden Einfluß hat. So wies BRUNK (1973) nach, daß in "pyrimidin tracts", d.h. einer Abfolge mehrerer Pyrimidine in einem DNS-Strang bei niedrigen Dosen die Bildung eines Dimers besonders begünstigt ist, vermutlich durch Energietransfer zwischen den Basen (GUERON und SHULMAN 1968). Selbst bei zwei benachbarten Pyrimidinen hat die Nachbarbase in 5'Stellung Einfluß auf die Wahrscheinlichkeit der Dimerbildung (BRUNK 1973).

Es ist also durchaus möglich, daß der Sequenzunterschied weniger Nukleotide in der Nachbarschaft des entscheidenden Codons dessen Mutierbarkeit je nach Stellung im Genom unterschiedlich beeinflußt. Derartige Positionseffekte sind gerade für die Mutation von ochre-Tripletts von verschiedenen Autoren auch bei Hefen nachgewiesen worden (SHERMAN et al. 1969, LAWRENCE et al. 1970).
Damit wäre z.B. zu erklären, daß die Häufigkeit der Locusmutanten der ade und lys Allele unterschiedlich ist, obwohl in beiden Fällen ein ochre-Codon rückmutieren muß.

Es ist jedoch auch denkbar, daß sich aufgrund nicht vollständiger Isogenität die Mutationsraten zweier Stämme unterscheiden. Da die in dieser Arbeit untersuchten Stämme durch mehrere Kreuzungen hergestellt wurden, ist eine völlige Isogenität nicht mehr gewährleistet. Es ist zwar unwahrscheinlich, daß die Stämme sich in der Zahl der Gene unterscheiden, jedoch sind geringe Unterschiede in der Feinstruktur denkbar und dies muß als Fehlermöglichkeit einkalkuliert werden.

4.1.3 Verschiedene Modelle zur Erklärung der Strahlen-Sensibilität der rad-Stämme

Wenn man aus dem Mutationsverhalten Rückschluß auf bestimmte Reparaturabläufe in der Zelle ziehen will, muß als Voraussetzung gesichert sein, daß die erhöhte Sensibilität der betreffenden Mutante tatsächlich durch den Funktionsverlust eines Reparaturenzyms verursacht ist. Dieses ist keine Selbstverständlichkeit, sondern grundsätzlich sind drei verschiedene Möglichkeiten denkbar, wie durch die Mutation eines Gens die erhöhte Strahlensensibilität der Mutante hervorgerufen werden kann:

1. Veränderungen bestimmter Zellstrukturen mit der Folge verstärkter bzw. veränderter Primärwirkung der Strahlung in der Zelle. Es gibt Hinweise darauf, daß Reparaturenzyme membrangebunden arbeiten (BOYLE 1972), so daß es durchaus denkbar ist, daß mutative Veränderungen der Kern- oder Zellmembran oder des Endoplasmatischen Retikulums der Zelle indirekt eine Sensibilitätserhöhung auslösen. Auch durch Veränderungen der Proteine, die an der Strukturierung der Chromosomen beteiligt sind, könnte die in der Zelle absorbierte Strahlung zu einer größeren Zahl ggf. auch qualitativ anderer Strahlenschäden in der DNS oder im Cytoplasma führen und damit eine Sensibilisierung der Mutante gegenüber UV-Strahlung verursachen.

2. Veränderung des physiologischen Zustandes der Zelle mit der Folge indirekter Beeinflussung eines Reparaturenzyms.
Es gibt eine große Anzahl an Untersuchungen darüber, daß die Strahlensensibilität einer Zellpopulation durch den physiologischen Zustand der Zellen beeinflußt wird: u.a. haben Nährstoffeffekte (review: KÖSSLER 1970) und die Energieversorgung (u.a. KIEFER 1971, SCHAARSCHMIDT 1972) einen Einfluß auf die Überlebenschance der Zellen nach Bestrahlung.

   SCHAARSCHMIDT (1972) hat für die in dieser Arbeit untersuchten rad Gene nachgewiesen, daß sie eine unterschiedliche Fähigkeit zur Depotbildung von Glucose bzw. zur Einschleusung angebotener Glucose in den Betriebsstoffwechsel in den jeweiligen Stämmen bewirken. Beides steht in positiver Korrelation mit dem Reparaturvermögen eines Stammes.
   Es wäre also denkbar, daß sich durch eine Mutation die Energieversorgung der Zelle verschlechtert, was sich sekundär bevorzugt auf einen Reparaturschritt, der besonders energieabhängig ist, auswirken würde. Hier wäre also ein Beispiel dafür gegeben, wie die Effektivität eines Reparaturschrittes indirekt beeinflußt werden könnte, ohne daß das Reparaturenzym selber durch Mutation verändert ist.

3. Veränderung in dem Strukturgen eines Reparaturenzyms, mit der Folge der direkten Strukturveränderung des Reparaturenzyms.

Mit biologischen Methoden kann nicht unterschieden werden, ob ein Reparaturenzym funktionsgestört ist durch die direkte Mutation des Strukturgens oder indirekt durch Mutation an einem anderen Locus, wodurch sekundär die Arbeitsfähigkeit beeinflußt wird. Eine Entscheidung kann nur durch die biochemische Analyse gefällt werden, welches Protein in der betreffenden Mutante fehlt oder verändert ist.

Es ist jedoch eine Aussage darüber möglich, ob durch den Strahlungsempfindlichkeit verursachenden Mutationsschritt eine allgemeine Sensibilisierung der Zelle für die UV-Strahlenwirkung oder die Störung eines Reparatursystems genetisch fixiert wurde. Eine Entscheidung sollte durch Untersuchung der Prozesse möglich sein, die nur als Veränderungen der DNS-Struktur verstanden werden können, nämlich Mutation und Rekombination, und die deshalb als "Spur" eines Reparaturvorganges an der DNS aufzufassen sind.

Formell betrachtet, bestehen zwei Möglichkeiten des Zusammenhanges von Mutation und Reparatur:

- Reparatur entfernt mutative Schäden.
  Ausfall der Reparatur sollte deshalb die reduzierte Entfernung mutativer Schäden zur Folge haben: die Mutationsrate der Mutante wird höher als beim Wildtyp.

- Reparatur ist an der Fixierung mutativer Veränderungen aus praemutativen Schäden beteiligt.
  Ausfall der Reparatur sollte die reduzierte oder fehlende Bildung mutativer Veränderungen zur Folge haben: die Mutationsrate der Mutante wird niedriger als beim Wildtyp.

Wenn das Mutationsverhalten der in dieser Arbeit untersuchten strahlensensiblen Stämme unter diesen Gesichtspunkten interpretiert wird, ergibt sich folgendes:

- Das rad2-20 Stamm verhält sich gemäß der ersten Hypothese. Bei gleicher Dosis (d.h. gleicher Zahl an Primärschäden) mit dem Wildtyp verglichen, ist mit stark erhöhter Letalität eine stark erhöhte Mutabilität verbunden (siehe Kap. 3.2.3). Das bedeutet, daß das von dem RAD2 Gen codierte Enzym an der Entfernung letaler und mutativer Schäden aus derDNS beteiligt ist.

- Das Verhalten des r_1^s und r_2^s Stammes läßt sich mit beiden Hypothesen nicht erklären, da trotz einer erhöhten Letalität keine gegenüber dem Wildtyp veränderte UV-Mutabilität auftritt (siehe Kap. 3.2.3).

  Von diesen Ergebnissen her gesehen, wäre also durchaus denkbar, daß durch diese rad Mutationen eine cytoplasmatische Sensibilisierung gegenüber UV-Strahlung verursacht wird, die sich bei den zur Prototrophie mutierten Zellen in gleicher Weise auswirkt wie bei der auxotrophen Zellpopulation, so daß die Mutationsrate unverändert bleibt.

  Gegen diese Annahme sprechen jedoch eindeutig die Ergebnisse, daß durch die r_1^s bzw. r_2^s Mutation die UV-induzierte mitotische Rekombinationsrate (KOWALSKI, unveröffentlicht), die spontane Mutabilität zur Adenin-Prototrophie (siehe Kap. 3.7) und die Mutation zur Atmungsdefizienz (siehe Kap. 3.8) z.T. erheblich beeinflußt werden. Dies sind alles Vorgänge, die nur durch Strukturveränderungen der nuklearen oder mitochondrialen DNS erklärt werden können.
  Offenbar wird also durch die r_1^s bzw. r_2^s Mutation durchaus die Funktionsfähigkeit von Enzymen beeinflußt, die an der Reparatur von Strahlenschäden an der DNS beteiligt sind. Daß dennoch die UV-induzierte Mutationsrate der strahlensensiblen Mutanten durch diese rad Mutation nicht verändert wird, sollte als Hinweis darauf gesehen werden, daß durchaus Enzymfunktionen denkbar sind, die die Höhe der UV-induzierten Mutationsrate nicht beeinflussen.

Damit aber scheint eine wichtige Voraussetzung erfüllt zu sein: Die Sensibilität der untersuchten Mutanten kann auf die veränderte Funktionstüchtigkeit eines Reparaturenzyms zurückgeführt werden. Dabei bleibt offen, ob dies durch die Mutation eines Strukturgens oder durch die Auswirkung einer Mutation eines anderen Gens auf

das Reparaturenzym verursacht wird.
Ein endgültiger Beweis ist nur durch biochemische Identifizierung des R_1^s bzw. R_2^s Genproduktes möglich.

4.2 Kontrollieren das R_1^s und R_2^s Gen einen Schritt des Excision Repair Systems?

Aus der Sensibilität einer Doppelmutante im Vergleich zu den Sensibilitäten der einzelnen Mutanten läßt sich ermitteln, ob die betreffenden Enzyme in einem gemeinsamen Reparatursystem arbeiten oder nicht.
Es lassen sich drei verschiedene Möglichkeiten der Interaktion unterscheiden (GAME und COX 1973):

- epistatisch
  Beide Enzyme arbeiten in einem Reparatursystem.
  Die Sensibilität der Doppelmutante ist nicht höher als die der sensibleren Einzelmutante.

- additiv
  Die Enzyme gehören verschiedenen Reparaturwegen an, die unterschiedliche Schäden als Substrat haben.
  Die Sensibilität der Doppelmutante entspricht der Summe der Sensibilitäten der Einzelmutanten; d.h. bei allen UV-Dosen entspricht die Überlebenswahrscheinlichkeit der Doppelmutante dem Produkt der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Einzelmutanten.

- synergistisch
  Die Enzyme gehören verschiedenen Reparaturwegen an, die gleiche Schäden als Substrat haben.
  Die Sensibilität der Doppelmutante ist wesentlich höher als die durch Additivität erwartete.

Nach dieser Klassifizierung beurteilt, müßte aufgrund der Sensibilität der r_1^srad2-2o Doppelmutante eine synergistische Interaktion des R_1^s und RAD 2-20 Gens angenommen werden (siehe Kap. 3.3.3). Das würde bedeuten, daß durch die r_1^sMutation ein anderes Reparatursystem in seiner Effektivität gemindert wird als durch die rad2 Mutation. Diese Hypothese vertritt AVERBECK (1970) und vermutet die Kontrolle eines REC-artigen Systems durch das R_1^s Gen.

Die geringe Sensibilitätserhöhung der Doppelmutante gegenüber der rad2-20 Mutante spricht jedoch dafür, daß der durch die r_1^s Mutation blockierte Reparaturweg recht unbedeutend neben dem Excision Repair Prozeß ist und nur einen kleinen Anteil des gemeinsamen Substrats repariert. Das wird deutlich, wenn man die Sensibilitätserhöhung der r_1^srad2-20 Doppelmutante mit der der supersensiblen Doppelmutante von KHAN et al. (1970) vergleicht. Diese Mutante trägt die Allele uvs 1-2 und uxs 1 (von RESNICK 1968 isoliert und von GAME und COX 1971 als rad1 bzw. rad18 klassifiziert) und zeigt gegenüber dem sensibleren Elter einen DRF von 46,5. Sie ist damit der $uvrA^-recA^-$ Doppelmutante von E.coli vergleichbar (HOWARD-FLANDERS und BOYCE 1966).

Es gibt auch verschiedene Doppelmutanten bei Hefen, die einen wesentlich niedrigeren DRF in Bezug auf den sensibleren Elter zeigen und bei denen dennoch von den jeweiligen Autoren die Ausschaltung synergistisch arbeitender Systeme vermutet wird:
Die von BROWN und KILBEY (1970) isolierten hypersensitiven Mutanten zeigen gegen den rad1 Elter DRF von 3,3 bzw. 4,6, die von LEMONTT (1970, 1971) hergestellten rev rad2-16 Doppelmutanten DRF zwischen 1,7 und 4 gegenüber der rad2-16 Mutante, die von GAME und COX (1973) isolierten rad50-1 rad3-2 bzw. rad51-1 rad3-2 Doppelmutanten gegen die rad3-2 Mutante DRF von 2,7 bzw. 5,1.

Dennoch gibt es Argumente dafür, daß das R^s_1 und RAD2 Gen Schritte in demselben Reparatursystem, nämlich dem Excision Repair System kontrollieren.
GAME und COX (1972) haben Beweise dafür, daß die RAD Gene 1 bis 4 Schritte des Excision Repair Systems kontrollieren. Aus diesen Genen zusammengekreuzte Vierfach-Mutanten zeigen leicht unterschiedliche Sensibilität. Eine der Sporen, 107-56, zeigt gegen die sensibelsten rad Mutanten, zu denen auch rad2-20 gehört, einen DRF von 1,5, der in der Größenordnung des DRF von 1,8 der r^s_1 rad2-20 Doppelmutante liegt; die Dosis, die die Vierfach-Mutante auf eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 1% abtötet, beträgt 25 erg mm^{-2} (GAME und COX 1972, Fig. 14), die entsprechende Dosis für die r^s_1 rad2-20 Mutante beträgt 24 erg mm^{-2} (Abb. 13). Das aber würde bedeuten, daß die r^s_1 Mutation in einer Mutante ohne Excision Repair keine weitere Sensibilitätserhöhung verursacht.

Darum erscheint es wahrscheinlicher, daß das R^s_1 Gen bei der Beseitigung von UV-Schäden einen Schritt des EXC-Systems kontrolliert, als daß es an einem zu dem EXC-System synergistischen Reparaturweg beteiligt ist.
Da die r^s_2 rad2-20 Doppelmutante dieselbe Sensibilität wie die r^s_1 rad2-20 Doppelmutante hat (AVERBECK 1970), könnten für das R^s_2 Gen die entsprechenden Überlegungen zutreffen.

Wenn durch das R^s_1 bzw. R^s_2 Gen ein auf die Excision der UV-Schäden folgender Schritt kontrolliert wird, könnte man vermuten, daß die Genprodukte Polymerasen oder Ligasen darstellen.
Beide Enzymfunktionen werden auch bei der Reparatur von Röntgenstrahlenschäden benötigt, so daß die gleichzeitige UV- und Rö-Sensibilität der Mutanten zu verstehen wäre.

Diese Hypothese kann unterstützt werden durch die Eigenschaften von vier temperatursensiblen und gleichzeitig strahlensensiblen Mutanten von Saccharomyces paradoxus (BANDAS et al. 1973). Die Mutanten zeigen bei der permissiven Temperatur (25°C) leichte UV- und Rö-Sensibilität (DRF liegen zwischen 1,5 und 3,0). Bei der nicht permissiven Temperatur (37°C) werden die Mutanten in ihrer Lebensfähigkeit stark beeinträchtigt, was auf eine Hemmung der DNS-Synthese (t x s 2) bzw. Hemmung der Zellteilung (t x s 4) zurückgeführt wird. Offenbar codieren die durch die t x s Mutation betroffenen Gene Enzyme, die an der Replikation und Reparatur von UV- und Rö-Schäden der DNS in gleicher Weise beteiligt sind. Dabei liegt es nahe, an Ligasen zu denken, die für den letzten Schritt des Reparaturprozesses und die Verknüpfung der OKAZAKI-Stücke bei der diskontinuierlichen DNS-Replikation nötig sind.

Ebenso könnte dieses Modell die unterschiedliche Sensibilität der rad2, r_1^s und r_2^s Mutanten gegen mono- und bialkylierende Agentien (LASKOWSKI und LEHMANN-BRAUNS 1973) weitgehend erklären. Monoalkylierende Chemikalien erzeugen vorwiegend Einzelstrangbrüche in der DNS, für deren Reparatur keine Endonuklease, jedoch alle weiteren Enzyme des EXC-Systems nötig sind. Die sehr geringe Sensibilität der rad2 Mutante im Gegensatz zu der höheren Sensibilität gegen Methylmethansulfonat bzw. Methylnitrosoguanidin der r_1^s und r_2^s Mutanten wäre daher verständlich.
Für die Reparatur von Strangvernetzungen, die durch bialkylierende Agentien verursacht werden, durch das EXC-System wäre auch die Endonuklease nötig, so daß die relativ hohe Sensibilität aller strahlensensiblen Mutanten gegen Diepoxybutan zu erklären wäre.

Auch bei E. coli sind für beide Enzymfunktionen Mutanten isoliert worden. Die bereits erwähnte polA⁻ Mutante, bei der die PolymeraseI

mutiert ist, zeigt UV- und Rö-Sensibilität (BOYLE et al. 1970, PATERSON et al. 1971). Durch Analyse der uvrA⁻polA⁻ Doppelmutante wurde die Zugehörigkeit zum Excision Repair System eindeutig bewiesen (MONK et al. 1971). Auch die Beteiligung der Polymerase I an der schnellen Reparatur von Rö-induzierten Einzelstrangbrüchen ist sicher (TOWN et al. 1971).
Die von PAULING und HAMM (1968) isolierte temperatursensible Ligasemutante von E.coli zeigt bei der nichtpermissiven Temperatur UV- und Rö-Sensibilität (DEAN und PAULING 1970). Da keine genetische Analyse vorliegt, ist nicht bekannt, in welchem Reparatursystem die Ligase arbeitet.

Die bei beiden r^s Mutanten geringe Sensibilität gegen UV ($DRF_{1\%}$ für r^s_1 bzw. r^s_2: 3, 14 bzw. 2, 7) und Rö ($DRF_{1\%}$ für beide Mutanten: 1, 6, AVERBECK 1970) sind entweder durch leakyness zu erklären oder dadurch, daß die jeweilige Funktion von anderen Enzymen z.T. übernommen werden kann.
So ist inzwischen bei E.coli nachgewiesen worden, daß bei Ausfall der Polymerase I die Reparatur-Synthese auch durch die Polymerasen II (MASKER und HANAWALT 1973, MASKER et al. 1973) und Polymerase III (YOUNGS und SMITH 1973) übernommen werden kann.

4.3 Mutationverhalten der rad Stämme

4.3.1 UV-Mutation von der Auxotrophie zur Prototrophie

Das Mutationsverhalten der strahlensensiblen Stämme kann im Rahmen des folgenden für Bakterien und auch für Hefen weitgehend zutreffenden Modells erklärt werden:
Pyrimidindimere und auch andere UV-Schäden, die nicht durch Excision Repair repariert werden, verursachen bei der Replikation Sekundärschäden, die bei der Reparatur durch ein fehlerhaft arbeitendes

System (bei Hefen: REV-System) mit bestimmter Wahrscheinlichkeit in mutative Schäden umgebildet werden.

Bei den rad2 Mutanten wurde durch biologische und biochemische Experimente nachgewiesen, daß sie aufgrund eines Endonuklease-defektes den ersten Schritt des Excision Repair, die Incision neben der Schadensstelle, nicht durchführen können. So verbleiben bei gleicher Bestrahlungsdosis viel mehr Schäden in der DNS als im Wildtyp. Da die rad2 Mutanten eine sehr hohe UV-Sensibilität und hohe UV-induzierte Mutabilität zeigen, ist zu schließen, daß aus der DNS nicht ausgeschnittene Schäden letal und mutagen wirken. Bei dem rad2-20 Stamm sind Letalität und Mutationsrate ca. 10^3fach höher als beim Wildtyp, wenn bei gleicher Dosis verglichen wird.

Die r_1^s und r_2^s Mutante zeigen, bei gleicher Dosis mit dem Wildtyp verglichen, die gleiche (oder nahezu gleiche) Mutationsrate, jedoch eine um den DRF von ca. 3 erhöhte UV-Sensibilität.

Man kann das Verhalten mit zwei verschiedenen Hypothesen erklären:

1. In den r^s Stämmen findet eine selektive Entfernung von UV-Schäden statt, d.h. der Incisions-, ggf. auch der Excisionsschritt des Excision Repairs ist schadensspezifisch unterschiedlich. Da die Stämme hinsichtlich des Koloniebildungsvermögens sensibler sind als der Wildtyp, ist die Reparatur letaler Schäden offenbar schlechter als im Wildtyp. Da die Mutationsrate jedoch gleich ist, müßten die mutativen Schäden intensiver repariert werden als die letalen.

Wenn man bedenkt, daß Pyrimidindimere einen großen Anteil sowohl der letalen und der mutativen Schäden ausmachen (siehe Kap. 3.6), erscheint die Hypothese der selektiven Reparatur unwahrscheinlich.

2. Wenn man annimmt, daß in den r^s Stämmen die gleiche Zahl an Schäden ausgeschnitten wird wie im Wildtyp, d.h. der Incisionsschritt unverändert ist, bliebe die gleiche Zahl an Schäden als Substrat für den fehlerhaft arbeitenden REV-Prozeß in der DNS erhalten. Wenn mutierte und nicht mutierte Zellen der r^sMutanten eine in gleichem Maße erhöhte Letalität zeigen, wäre die unveränderte Mutationsrate im Vergleich zum Wildtyp erklärt.

   Beide Bedingungen können in einer Polymerase- oder Ligase-defekten Mutante erfüllt sein. Beide Enzyme haben keinen Einfluß auf die Zahl der ausgeschnittenen Schäden (bei der Bakterienmutante $polA^-$ ist lediglich die Geschwindigkeit der Excision gemindert, BOYLE et al. 1970), sondern nur auf die Reparatursynthese nach Excision. Ein Defekt würde also die Zahl der in der DNS verbleibenden Schäden und damit einen die Mutationsrate bestimmenden Faktor nicht beeinflussen.
   Die Letalität der Zellen könnte durch eine vermehrte Zahl an Stranglücken (gaps) oder -brüchen(nicks) verursacht sein, die vermehrten Angriff durch Exonukleasen und damit DNS-Degradierung zur Folge hätten.

Man kann das Mutationsverhalten der Stämme allerdings auch erklären, wenn man eine durch Mutation in der Reparatureffektivität verminderte, aber in der Fehlerhaftigkeit unveränderte REV-Reparatur annimmt.

Es bestätigt sich jedoch, daß bei Hefen - im Gegensatz zu Bakterien - Mutationsereignisse, die im Verlauf mitotischer Teilungen entstehen, nicht an Rekombinationsereignisse gebunden sind (LEMONTT 1970, 1971c). Während die UV-Mutabilität des r^s_1 und r^s_2 Haplonten der des Wildtyps entspricht, zeigen die zugehörigen Diplonten ein vom Wild-

typ abweichendes, mitotisches Rekombinationsverhalten. Der r_1^s r_1^s Diplont rekombiniert wesentlich häufiger als der Wildtyp, der $r_2^s r_2^s$ Diplont dagegen überhaupt nicht (KOWALSKI, unveröffentlicht).

4.3.2 Unterschiedlicher Einfluß der rad Gene auf die Locus- und Suppressormutation

Im vorhergehenden Abschnitt wurde der Einfluß der rad Gene auf die UV-induzierte Reversion zur Prototrophie ohne Unterscheidung in Locus- und Suppressormutanten untersucht. Das erscheint zulässig, da ein im Prinzip ähnliches Verhalten vorliegt: sowohl die Locus- als auch die Suppressor-Mutationsrate sind bei der rad2-20 Mutante wesentlich höher als im Wildtyp bzw. bei dem r_1^s und r_2^s Stamm nahezu so hoch wie im Wildtyp, wenn man bei gleicher Dosis vergleicht.
In Kap. 3.4 war jedoch ein genspezifischer Einfluß auf die Höhe der Locus- bzw. Suppressor-Mutationsrate beschrieben worden. Diese Unterschiede sollten Beachtung finden, wenn Vorstellungen über mögliche Mutationsmechanismen diskutiert werden.

Um diese Unterschiede deutlich darstellen zu können, wird eine andere Auftragungsart gewählt als die logarithmische Auftragung der Mutationsrate in Abhängigkeit von der induzierenden UV-Dosis: die Mutationsrate wird doppeltlogarithmisch über der Überlebensrate aufgetragen, die durch die abtötende Wirkung der induzierten UV-Dosis bedingt wird. Nach WITKIN (1966) erlaubt diese Auftragungsweise einen Vergleich der Reparatureffektivität an letalen und mutativen Schäden verschiedener Stämme im Vergleich zu einem Normstamm.

Es sind drei Möglickeiten denkbar, wie die Wildtypkurve im Vergleich zu der Kurve einer Mutante liegen kann.

- Wildtyp- und Mutantenkurve decken sich:
  in beiden Stämmen werden letale und mutative Schäden mit gleicher Effizienz repariert.
- Die Mutantenkurve liegt über der Wildtypkurve:
  die Mutante repariert die mutativen Schäden mit geringerer Effektivität als die letalen im Vergleich zum Wildtyp.
- Die Mutantenkurve liegt unter der Wildtypkurve:
  die Mutante repariert die mutativen Schäden besser als die letalen im Vergleich zum Wildtyp.

Vergleich der Locusmutationsraten bei Auftragung über den Überlebenden

In Abb. 36 sind die ADE- bzw. LYS-Locusmutationsraten des Wildtyps im Vergleich zu denen der sensiblen Stämme über den zugehöri-

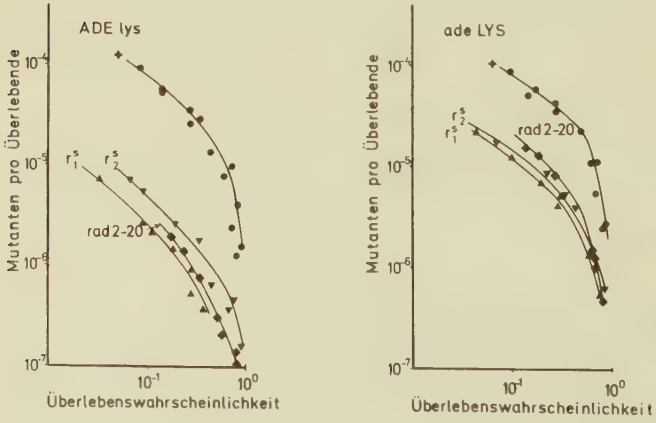


Abb. 36:
Abhängigkeit der UV-induzierten ADENIN- und LYSIN-Locusmutationsrate (ADE lys bzw. ade LYS) von der Überlebenswahrscheinlichkeit, die durch die induzierende UV-Dosis bedingt ist. Verglichen wird der Wildtyp mit den sensiblen Mutanten (r^s_1, r^s_2 rad2-2o).

gen Überlebensraten doppeltlogarithmisch aufgetragen.
Dabei zeigt sich, daß die ADE- und LYS-Locusmutationskurven des Wildtyps, bei gleicher Überlebensrate verglichen, d.h. also bei einer gleichen Zahl an nicht reparierten letalen Schäden, beträchtlich über denen der sensiblen Stämme liegen, und zwar im Falle der Adeninmutanten um die Faktoren 48 (r_1^s), 18 (r_2^s) bzw. 33 (rad2-20), im Falle der LYS-Mutanten um den Faktor von ca. 7 höher (jeweils bei 37%ü verglichen).

Bei diesem Ergebnis ist zweierlei interessant:
Erstens scheint hier ein Beispiel für den Einfluß der Stellung eines Codons im Genom auf die Mutierbarkeit dieses Codons vorzuliegen, da im Wildtyp die ADE-Mutationsrate gleich hoch ist wie die LYS-Mutationsrate, in den sensiblen Stämmen jedoch um mehr als ein Drittel tiefer liegt. Es ist jedoch nicht zu entscheiden, ob hierbei stammspezifische Unterschiede in der Feinstruktur durch unterschiedliche Nachbarnukleotide oder die Reparaturfähigkeit die Ursache sind.
Beide Einflüsse können aber tatsächlich wirksam werden.
Die unterschiedliche mutative Wirkung von UV-Bestrahlung auf ein UAG-Codon, das an zwei verschiedenen Positionen des Iso-1-Cytochrom Gens liegt, wurde von SHERMAN et al. (1969) nachgewiesen. Obwohl in beiden Fällen im Protein Glutaminsäure akzeptabel wäre, wurde es in der einen Position in 11 Fällen, in der anderen Position gar nicht gefunden.
LAWRENCE et al. (1970) haben nachgewiesen, daß durch ein uvs9- bzw. uvs6 Mutation (nach rad Nomenklatur rad2 bzw. rad6, GAME und COX 1971) diese Aminosäurespezifität in unterschiedlicher Weise verändert wird.

Zweitens ist es erstaunlich, daß die Locusmutationskurven aller drei Mutanten nahe zusammen unter dem Wildtyp liegen. Das bedeutet

also offenbar, daß in jedem sensiblen Stamm die mutativen Schäden der Reparatur wesentlich stärker unterliegen als die letalen. Das Verhalten des r^s_1 und r^s_2 Stammes ist nicht verwunderlich, da bereits aus den Abbildungen 6 und 7 hervorging, daß durch diese Mutationen die Reparatur der letalen Schäden mit geringerer Effektivität erfolgt als die der mutativen. Es wurde jedoch angenommen, daß der Ausfall des EXC-Systems die Erhaltung letaler und mutativer Schäden in der DNS in gleicher Weise betrifft. So wäre zu erwarten gewesen, daß die Mutationskurven des Wildtyps und der rad2-20 Mutante aufeinanderfallen.

Für dieses Verhalten gibt es zwei Möglichkeiten der Deutung:

1. Die mutativen Schäden sind vorwiegend solche, die durch Reparaturenzyme nicht angegriffen werden. Bei der Zunahme solcher Schäden mit der Dosis sollten, bei gleicher Überlebensrate verglichen, im Wildtyp aufgrund der höheren Dosis viel mehr Schäden dieser Art vorhanden sein als in der strahlensensiblen Mutanten. Allerdings wäre dann zu erwarten, daß die Kurven der mittelsensiblen Stämme zwischen der rad2-20 Mutante und dem Wildtyp lägen.

2. Das fehlerhaft arbeitende Reparatursystem hat eine dosisabhängige Fehlerhaftigkeit, d.h. es arbeitet bei niedrigen Dosen, gleichbedeutend mit geringen Schadenszahlen, exakter als bei höheren Dosen.
   Diese Hypothese ist experimentell schwer nachprüfbar.

Vergleich der Suppressormutationsraten bei Auftragung über den Überlebenden

In den Abbildungen 37 und 38 sind die Suppressormutationsraten des Wildtyps mit denen der sensiblen Stämme bei gleicher Überlebenswahrscheinlichkeit verglichen.

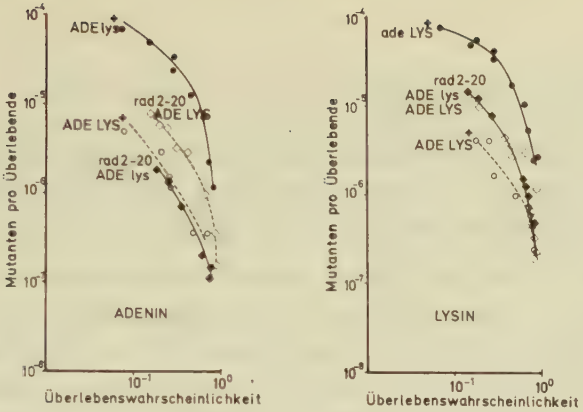


Abb. 37:
Abhängigkeit der UV-induzierten ADENIN- und LYSIN-Locus- und Suppressormutationsraten (ADE lys, ade LYS bzw. ADE LYS) von der Überlebenswahrscheinlichkeit, die durch die induzierende UV-Dosis bedingt ist.
Vergleich des Wildtyps mit der rad2-20 Mutante.

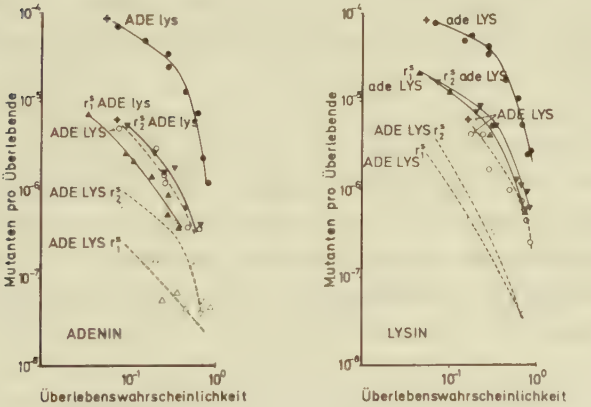


Abb. 38:
Abhängigkeit der UV-induzierten ADENIN- und LYSIN-Locus- und Suppressormutationsraten (ADE lys, ade LYS bzw. ADE LYS) von der Überlebenswahrscheinlichkeit, die durch die induzierende UV-Dosis bedingt ist.
Der Wildtyp wird mit der r_1^s und r_2^s Mutante verglichen.

Aus den Graphiken ergibt sich:

- Die Häufigkeit von Suppressormutationen im Wildtyp ist wesentlich geringer als die der Locusmutation. Bei 37%ü beträgt sie nur 5% der Häufigkeit von Locusmutationen.
- Das Verhalten des r_1^s und r_2^s Stammes ist wiederum ähnlich wie das des Wildtyps. In beiden Stämmen liegen die Suppressormutationsraten tiefer als die Locusmutationsraten. Allerdings beträgt die Suppressorenhäufigkeit ca. 10 bis 20% der Häufigkeit der Locusmutanten, so daß bei den Stämmen ggf. ein geringer locusspezifischer Einfluß auf das Reparaturvermögen vorhanden sein könnte.
- Einen sehr deutlichen Einfluß auf die Locus- bzw. Suppressormutationsinduktion hat das rad2-20 Gen. Während die rad2-20 Mutante eine wesentlich niedrigere Locusmutationskurve zeigt als der Wildtyp, liegen die Kurven für die Suppressormutationsraten, bei 37%ü verglichen, um das dreifache höher als die des Wildtyps.

Da das Verhältnis der Häufigkeit der Locusmutanten und der Suppressormutanten durch die Strahlensensibilität verursachende Gene beeinflußt wird, scheint im reparaturkompetenten Wildtyp die Reparatur der Strahlenschäden Genort-spezifisch zu sein.
Zur Erklärung dieses Verhaltens lassen sich mehrere Arbeitshypothesen finden:

1. Unterschiedliche Reparierbarkeit der Schäden.

   Unter der Voraussetzung, daß der rad2-20 Stamm nicht oder nur in geringem Maße leaky ist, läßt sich aus den Ergebnissen schließen, daß im Wildtyp Excision Repair von Schäden, die Locusmutationen verursachen können, weniger effektiv ist als die der Schäden in den Suppressorgenen.

Die unterschiedliche Reparierbarkeit könnte entweder durch unterschiedliche UV-Photoprodukte begründet sein, die sich in den beiden verschiedenen Typen von Genen bilden, oder durch unterschiedliche Struktur der Chromosomen oder DNS in den jeweiligen Genbereichen, die die Arbeit der Reparaturenzyme hemmen oder fördern könnte.

Auch bei E. coli gibt es Hinweise auf unterschiedliche Reparatur von Locus- bzw. Suppressormutationen auslösende Schäden. Nur in angereicherten Mangelmedien können Suppressormutanten in großen Mengen isoliert werden (WITKIN 1956), andernfalls tritt eine schnelle Abnahme an Suppressormutanten ein (sog. "mutation frequency decline"). Von BRIDGES et al. (1967) und WITKIN (1966) wird dieser Effekt als ein besonderer Fall von Excision Repair interpretiert, die im Falle von sofort nach Bestrahlen beginnender Proteinsynthese nicht stattfinden kann.

Da bei Substitution des Mangelmediums mit Adenin (siehe Kap. 3.4.3) gerade der reparaturdefekte rad2-20 Stamm den höheren Zuwachs an Mutanten zeigt und nicht der Wildtyp, ist es fraglich, ob die für Bakterien vermutete Erklärung auf Hefen zutrifft.

2. Unterschiedliche Mutationstypen

In verschiedenen Organismen ist übereinstimmend nachgewiesen worden, daß durch UV-Strahlung sowohl Basenpaar-Substitution (BPS) [bevorzugt G:C → A:T-Transitionen], als auch Additions-Deletions-Mutationen (AD-DEL) induziert werden (review: DRAKE 1969b).
Bei Saccharomyces wurde von MAGNI und v. BORSTEL (1962) gezeigt, daß Suppressormutationen fast ausschließlich durch AD-DEL verursacht werden, wenn auch in geringem Umfang BPS auftreten können (v. BORSTEL et al 1971). Die ochre-Codone in

den Struktur-Genen können jedoch nur durch BPS erfolgreich zu einem Sinn-Triplett rückmutieren.
Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß an den ochre-Codonen und den Suppressorgenen unterschiedliche Mutationstypen auftreten müssen, damit eine Mutation zur Prototrophie möglich wird. Excision Repair kann darauf einen unterschiedlichen Einfluß haben.

3. Unterschiedliche Mutationsmechanismen

Solange über den detaillierten Ablauf des Mutationsprozesses nichts Näheres bekannt ist, ist nicht auszuschließen, daß unterschiedliche UV-Schäden durch unterschiedliche molekulare Abläufe mutagen werden. Daraus können ggf. unterschiedliche Mutationstypen resultieren.

Einen Hinweis darauf, daß Locus- und Suppressormutationen über unterschiedliche molekulare Zwischenschritte entstehen, glauben NISHIOKA und DOUDNEY (1969a,b) bei E. coli durch unterschiedliche Photoreaktivierungskinetiken von Locus- und Suppressormutanten nachweisen zu können. Die Locusmutanten verlieren ihre Photoreaktivierbarkeit sehr schnell, und zwar mit einer Kinetik, die der Dimer-Excision entspricht. Dagegen erhalten Suppressormutanten ihre Photoreaktivierbarkeit relativ lange und verlieren sie mit einer Kinetik, die der DNS-Replikation entspricht. Die Ergebnisse werden von NISHIOKA und DOUDNEY so interpretiert, daß Locusmutationen als Folge von Excision Repair an den Stranglücken ("excision gaps") entstehen, während Suppressormutationen gerade durch die nicht ausgeschnittenen, sondern replizierten Pyrimidindimere induziert werden, die in den neusynthetisierten DNS-Strängen "daughterstrand gaps" als Sekundärschäden verursachen, die ebenfalls fehlerhaft geschlossen werden können.

Für beide Vorgänge sind die RECA und EXR Genprodukte notwendig, damit eine mutative Veränderung entsteht (NISHIOKA und DOUDNEY 1969a,b). Das bedeutet also nicht die Umkehrung der Hypothese, daß Excision Repair fehlerfrei arbeitet, sondern nur eine Erweiterung dahin, daß der fehlerhaft arbeitende Reparaturmechanismus, der durch das RECA und EXR Gen kontrolliert wird, unter geeigneten Umständen auch an excision gaps arbeiten und mutativ wirken kann. Daß der Syntheseschritt nach dem Ausschneiden des Schadens z.T. auch von Enzymen des REC-Systems kontrolliert werden kann, konnte von COOPER und HANAWALT (1972a,b) nachgewiesen werden.

Gesetzt den Fall, das bei Bakterien diskutierte Modell ist auch bei Hefen als Arbeitshypothese zu verwenden, ergäbe sich die Möglichkeit, das Verhalten der rad2-20 Mutante einleuchtend zu erklären.

Die im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Locusmutation würde durch die fehlenden excision gaps, die mutationsinduzierend wirken, erklärbar sein, und die erhöhte Suppressormutation gerade durch die Erhaltung der induzierend wirkenden Pyrimidindimere. Allerdings müssen auch Locusmutationen durch nicht ausgeschnittene Dimere entstehen können. Sonst wäre nicht zu erklären, wieso überhaupt Locusmutanten in der Excision Repair-defekten Mutante entstehen.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß Locus- und Suppressormutanten auch bei Hefen auf unterschiedliche Weise entstehen, gibt auch das Verhalten der rev Mutanten, die von LEMONTT (1970, 1971a) isoliert und untersucht wurden. Diese Mutanten induzieren zwar so gut wie keine Locusmutanten und zeigen daher ein den rec⁻ Bakterien vergleichbares Verhalten, haben jedoch z.T. eine im Vergleich zum Wildtyp wesentlich erhöhte Suppressormutationsrate.

Es erscheint also durchaus möglich, daß auch bei Hefen Locus- und Suppressormutanten durch

- unterschiedliche Schäden
- unterschiedliche Reparierbarkeit der Schäden
- unterschiedliche Mutationstypen
- unterschiedliche Mutationsmechanismen

auftreten können.

4.3.3 Einfluß der rad Gene auf die spontane Mutation

Spontane Mutationen, eine der Voraussetzungen für evolutive Entwicklung, erschienen in einem neuen Licht, als es immer mehr Beweise dafür gab, daß die Häufigkeit spontaner Mutationen sich selber unter der Kontrolle der Evolution entwickelt hatte (v. BORSTEL 1969). Es gibt heute zahlreiche Beweise dafür, daß spontane Mutationen durch fehlerhaftes Arbeiten von Enzymen entstehen, die irgendwelche Funktionen im DNS-Stoffwechsel haben.

Gut untersucht als mutagene Enzyme sind die Polymerasen von T4 und E. coli. Durch die Isolierung einer großen Anzahl an temperatursensiblen Polymerase-Mutanten mit Mutator- und Antimutatoreigenschaften (SPEYER 1965, DRAKE 1969a, b, DRAKE und ALLEN 1968, ALLEN et al. 1970) konnte bewiesen werden, daß sowohl die Höhe der spontanen Mutationshäufigkeit als auch die Spezifität des Mutationsschritts genetisch festgelegt ist. Es gibt Mutanten, die spezifisch nur die Rate der AD-DEL-Mutanten erhöhen, andere, die nur die A:T $\rightarrow$ G:C-Transition beeinflussen (DRAKE 1973). Auch die polA$^-$ Mutante von E. coli hat gegenüber dem Wildtyp eine um den Faktor 2 bis 4 erhöhte Mutationsrate von BPS und AD-DEL-Mutationen (COUKELL und YANOWSKI 1970, ISHII und KONDO 1972), während uvr$^-$ und rec$^-$ Mutanten die spontane Mutation nicht beeinflussen (KONDO et al. 1970, KONDO 1973).

Da bei den Polymerasen von T4 und E. coli bifunktionelle Enzyme mit Polymerase- und Exonukleasefunktion in einem Molekül vorliegen (GOULIAN et al. 1968, NOSSAL und HERSHFIELD 1971, SETLOW et al. 1972a, b) ist bei der DNS-Synthese eine doppelte Absicherung getroffen worden: durch die Auswahlspezifität bei dem Einbau der Nukleotide und durch Exonukleaseaktivität an falsch gepaarten Nukleotiden wird der Grad der Exaktheit der DNS-Replikation kontrolliert (BRUTLAG und KORNBERG 1972, HERSHFIELD und NOSSAL 1972, HALL 1973).

Auch bei Hefen sind verschiedene Funktionen bekannt, die deutlich Einfluß auf die spontane Mutabilität nehmen:

- Offenbar üben Reparatursysteme auch eine Kontrolle bei der DNS-Replikation aus, da strahlensensible Mutanten häufig eine erhöhte spontane Mutationsrate zeigen (DE SERRES 1971, LOPRIENO 1971, v. BORSTEL et al. 1968, 1971, ZAKHAROV et al. 1970).
- Mit meiotischer Rekombination ist häufig eine spezifische Erhöhung der AD-DEL-Mutation verbunden ("meiotischer Effekt") [MAGNI und v. BORSTEL 1962, MAGNI und SORA 1969].
- Atmungsdefekte Stämme haben spezifische Mutatoreigenschaft für Transversionen (v. BORSTEL et al. 1973).

Außerdem gibt es noch eine Anzahl in ihrer Ursache noch nicht erforschte Mutatorgene (v. BORSTEL et al. 1973).

Die Ergebnisse in Tabelle 6 (siehe Kap. 3.7.1), die Aussage über den mittleren spontanen Anteil an Prototrophen in unbestrahlten Kontrollsuspensionen macht, und die mit Hilfe des Fluktuationstest (Kap. 3.7.2) bestimmten spontanen Mutationsraten zur ADE-Prototrophie im Wild-

typ und den sensiblen Mutanten zeigen, daß auch in diesen Stämmen die Höhe der spontanen Mutationsrate von mindestens zwei Faktoren beeinflußt wird:

1. Atmungsfähigkeit einer Population
2. Reparaturfähigkeit eines Stammes

Fraglich ist, ob die beiden Faktoren tatsächlich zwei verschiedene Mechanismen betreffen, die an der Entstehung spontaner Mutation beteiligt sind, oder ob sie nicht beide über denselben Weg die spontane Mutabilität beeinflussen.

Auf jeden Fall scheint der aus Abbildung 34 hervorgehende Zusammenhang zwischen der Höhe der spontanen LYS-Mutationsrate und dem Anteil an Atmungsdefekten in der Zellsuspension einen Hinweis darauf zu geben, daß die Mutatoreigenschaft eines atmungsdefekten Stammes durch den in Vergleich zu atmungskompetenten Stämmen ungünstigeren Energiehaushalt zu erklären sein könnte.

Wie bereits erwähnt, haben SCHAARSCHMIDT (1972) und SCHAARSCHMIDT et al.(1973) nachgewiesen, daß bei den sensiblen Mutanten eine reduzierte Depotbildung von Glucose bzw. eine reduzierte Fähigkeit, im Medium angebotene Glucose in den Betriebsstoffwechsel einzuführen, im Vergleich zum Wildtyp vorhanden ist. Das kann zur Folge haben, daß ein genetisch bedingter Reparaturdefekt sich aufgrund des ungünstigen Energiehaushaltes noch ungünstiger auswirkt.
Es ist nicht zu entscheiden, ob die erhöhte spontane Mutationsrate der sensiblen Stämme durch unterschiedlich funktionsfähige Reparatursysteme in den verschiedenen Stämmen bedingt sind, was sich ggf. durch eine schlechtere Energieversorgung dann noch besonders äußert, oder ob ein in allen Stämmen in gleicher Weise funktionsfähiges Enzymsystem durch die unterschiedliche Energiehaushaltung unterschiedlich beeinflußt wird.

Es sei nur darauf hingewiesen, daß Endonuclease-defekte Bakterienstämme (KONDO et al. 1970, ISHII und KONDO 1972, KONDO 1973) und auch andere von v. BORSTEL et al. (1971) untersuchte rad2 Stämme im Gegensatz zu der rad2-20 Mutante keine erhöhte spontane Mutabilität zeigen.
Sollten die r_1^s und r_2^s Mutanten tatsächlich Polymerase-defekte Stämme sein, wäre bei ihnen eine Erhöhung der spontanen Mutationsrate ein weiteres zu der pol A$^-$ Mutante der Bakterien analoges Verhalten.

4.3.4 Einfluß der rad Gene auf die Induktion von atmungsdefekten Mutanten

Es ist bekannt, daß atmungsdefekte Mutanten durch die Veränderung von Mitochondrien-DNS entstehen, die sich entweder in einer mehr oder minder starken Sequenzänderung (MOUNOLOU et al. 1966) oder einem teilweisen oder völligen Verlust der DNS (NAGLEY und LINNANE 1970, WILLIAMSON 1970) äußert. Diese Veränderungen werden auch durch Pyrimidindimere ausgelöst, was durch die Beeinflussung durch Photoreaktivierung von PITTMANN et al. (1959a, b) nachgewiesen wurde. Deshalb stellt sich die Frage, ob die für die Reparatur der Kernschäden bekannten Reparaturenzyme auch an Mitochondrien-DNS arbeiten. Daß Dunkelreparatur UV-geschädigter Mitochondrien-DNS erfolgt, wurde von MAROUDAS und WILKIE (1968) und MOUSTACCHI und ENTERIC (1970) gezeigt.

MOUSTACCHI (1971) untersuchte systematisch 21 verschiedene rad Mutanten im Vergleich zum strahlenresistenten Wildtyp hinsichtlich der Empfindlichkeit gegen chromosomale DNS-Schäden mit Hilfe von Dosis-Effekt-Kurven und Mutationskurven sowie in ihrer Sensibilität gegen mitochondriale DNS-Schäden an Hand der Induktions-Kurven atmungsdefekter Mutanten.

Es können drei verschiedene Gruppen erwartet werden (MOUSTACCHI 1971):

A : ein RAD Gen ist nur bei der Reparatur der Kern-DNS, nicht an der der Mitochondrien-DNS beteiligt; bei einer rad Mutation wird die gleiche petite-Induktionsrate wie beim Wildtyp erwartet.

B, B′: ein RAD Gen ist bei der Reparatur der Kern-DNS und der Mitochondrien-DNS beteiligt, und zwar sind zwei verschiedene Möglichkeiten denkbar:

B: die Mutanten zeigen eine erhöhte petite-Induktion im Vergleich zu dem Wildtyp, entsprechend dem uvr^- Verhalten bei Bakterien.

B′: die Mutanten zeigen eine reduzierte petite-Induktion im Vergleich zu dem Wildtyp, entsprechend dem rec^- und exr^- Verhalten bei Bakterien.

Alle untersuchten rad Mutanten konnten in eine der drei Gruppen eingegliedert werden: 11 in Gruppe A(u.a. rad1 und rad4), 6 in Gruppe B (u.a. rad2) und 2 in Gruppe B′(rad6, rad15).

C : stellt einen weiteren Typ dar, den man erwarten sollte bei Codierung eines Reparaturenzyms, das nur für die Reparatur der Mitochondrien-DNS verantwortlich ist. Diese Mutante sollte die gleiche UV-Sensibilität wie der Wildtyp besitzen, jedoch eine veränderte petite-Induktion.

Bei der Klassifizierung ist auffällig, daß Gene, die bei der Kernreparatur nachweislich einem gemeinsamen Reparatur-System angehören, wie z.B. rad1 und rad2 (GAME und COX 1972) bei der Mitochondrien-DNS-Reparatur unterschiedliches Verhalten zeigen. Offenbar werden also nicht gesamte Reparatursysteme, sondern nur bestimmte Enzyme in die Mitochondrien delegiert.

Aus Abb. 35 geht hervor, daß die sensiblen Mutanten (r_1^s und rad2-20) bei gleicher Dosis eine höhere Induktion atmungsdefekter Mutanten zeigen als der Wildtyp.
Beide Stämme sind in Gruppe B einzuordnen; d.h. offenbar, daß beide Strahlensensibilität verursachende Gene an der Reparatur von chromosomaler und mitochondrialer DNS beteiligt sind.

Ein Vergleich der Reparatureffektivität an Kern- und Mitochondrien-DNS in Bezug auf den Wildtyp ist möglich durch Auftragung der Induktionskurven über den Überlebenden nach UV-Bestrahlung.
Man kann damit keine absoluten Aussagen machen, da ja das Maß der Reparatur an Kern- bzw. Mitochondrien-DNS im Wildtyp nicht bekannt ist, aber man kann dadurch, daß die Induktionskurven über oder unter der Wildtypkurve liegen, feststellen, ob sich dieses Verhältnis in einem sensiblen Stamm geändert hat.

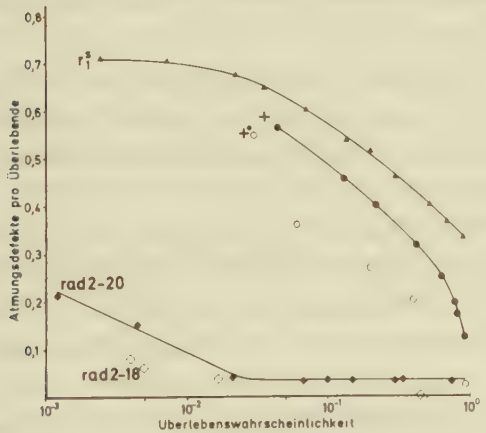


Abb. 39:

Abhängigkeit der UV-induzierten Mutationsrate zur Atmungsdefizienz von der Überlebenswahrscheinlichkeit, die durch die induzierende UV-Dosis bedingt ist.
Vergleich des Wildtyps (+), der r_1^s und rad2-20 Mutante mit dem von MOUSTACCHI untersuchten Wildtyp (+*) und der rad2-18 Mutante.

Aus Abbildung 39 geht hervor:

Die Kurve des rad2-20 Stammes liegt weit unter, die des r_1^s Stammes über der Wildtypkurve, d.h. bei gleicher Überlebensrate (= einer gleichen verbleibenden mittleren Zahl an letalen Schäden in der Kern-DNS nach erfolgter Reparatur) bleibt in den drei Stämmen eine unterschiedliche Zahl an nicht reparierten Schäden in der Mitochondrien-DNS erhalten.

Zum Vergleich mit den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen sind der von MOUSTACCHI (1971) untersuchte Wildtyp und der rad2-18 Stamm eingezeichnet, die einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigen wie unsere Stämme, abgesehen von der hohen spontanen Rate unserer Stämme. Da in dem rad2 Stamm in den Mitochondrien weniger Schäden erhalten bleiben als im Kern, geht der steile Anstieg der Induktionskurve über der UV-Dosis auf die starke Reduktion der Überlebensrate zurück. Offenbar ist das RAD2 Genprodukt an der Reparatur von Kernschäden viel stärker beteiligt als an den Schäden in der Mitochondrien-DNS.

Ein interessanter Unterschied im Kurvenverlauf der rad2 Stämme und Wildtypen sollte bemerkt werden: bis zu einer Überlebensrate von 1 bis 2% zeigen die hochsensiblen Stämme keine Induktion atmungsdefekter Mutanten.
Das bedeutet entweder, daß bis ca. 40 erg mm^{-2} in den Mitochondrien keine UV-Schäden gebildet oder aber vollständig repariert werden, oder daß auch atmungsdefekte Mutanten durch ein fehlerhaft arbeitendes Reparatursystem entstehen, das dosisabhängig arbeitet.
Die rad6 Mutante, die eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Reversion zur Prototrophie und überhaupt keine petite-Induktion zeigt (MOUSTACCHI 1971), könnte als defekt in diesem fehlerhaft arbeitenden Reparatursystem angesehen werden.

Im r_1^s Stamm ist die Zahl der mitochondrialen Schäden bei gleicher Zahl an "akuten" letalen Schäden größer als im Wildtyp.
Das kann entweder bedeuten, daß das R_1^s Gen an der Reparatur mitochondrialer DNS-Defekte stärker beteiligt ist als an der Reparatur von Kernschäden, oder aber im Falle eines defekten, jedoch nicht vollständig funktionsunfähigen Enzyms in der Mutante, daß sich der Defekt in einer erhöhten Fehlerhaftigkeit bei der Mitochondrien-DNS-Reparatur äußert.

Nimmt man an, daß durch die r_1^s Mutation eine Polymerase geschädigt ist, wäre vorstellbar, daß diese Polymerase außer Reparaturaufgaben auch an der Replikation der Mitochondrien-DNS beteiligt ist und durch die Mutation sehr fehlerhaft repliziert; damit wäre die hohe spontane Mutabilität erklärbar.

Einen neuen Hinweis auf den molekularen Ablauf der Induktion atmungsdefekter Mutanten erbrachten die Untersuchungen von MOUSTACCHI (1973) an zwei rec^- Mutanten von Saccharomyces (RODARTE-RAMON 1972), die eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte mitotische intragenische Rekombination zeigen. Auch die petite-Induktion ist bei diesen Mutanten reduziert.
Aus diesem Ergebnis schließt MOUSTACCHI, daß UV-Schäden in der Mitochondrien-DNS zu Rekombinationsvorgängen Anlaß geben, die unvollständig verlaufen und zu DNS-Verlusten führen können. Eine atmungsdefekte "Mutante" würde demnach durch fehlerhafte Rekombination entstehen.

Das Verhalten bei der Mutation zur Atmungsdefizienz der r_1^s Mutante entspricht deren mitotischen Rekombinationsverhalten (KOWALSKI, unveröffentlicht); in beiden Fällen findet sich eine Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp.
Dagegen zeigt die r_2^s Mutante eine erhöhte Induktion atmungsdefekter Mutanten, jedoch keinerlei mitotische Rekombination.

4.3.5 Schlußfolgerungen aus dem Mutationsverhalten der strahlensensiblen Mutanten

Am Ende dieses Abschnittes, in dem der Einfluß der rad Gene auf die spontane und UV-induzierte Mutation zur Prototrophie und die spontane und UV-induzierte Mutation zur Atmungsdefizienz diskutiert wurde, erscheint eine Zusammenfassung darüber sinnvoll, wie die betreffenden RAD-Genprodukte am Reparaturgeschehen und der Mutationsinduktion einer Hefezelle beteiligt sein können.

Die Eigenschaften der rad2-20 Mutante entsprechen weitgehend den Ergebnissen, die mit Endonuklease-defekten Bakterienstämmen und entsprechenden anderen Hefemutanten, die keine Schäden aus ihrer DNS ausschneiden können, gefunden wurde:

- Das RAD2 Genprodukt ist an der Entfernung letaler und mutativer Schäden aus der chromosomalen DNS beteiligt. In der rad2-20 Mutante ist aufgrund dieser Mutation die Zahl der letalen Schäden in der DNS sehr hoch, die Überlebenschance der Zellen gering. Es bleiben auch mehr mutative Schäden in der DNS enthalten, die durch ein bei Hefen im molekularen Ablauf noch nicht bekanntes Reparatursystem in Informationsänderungen überführt werden. Damit ist auch die Mutationsrate bei gleicher Dosis stark erhöht im Vergleich zum Wildtyp.

- Aus der im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Häufigkeit der Suppressormutanten an der Gesamtzahl an Revertanten ergibt sich ein Hinweis darauf, daß Excision Repair bei der Entstehung von Locus- und Suppressormutationen in unterschiedlicher Weise beteiligt ist. Auch ist es denkbar, daß reparaturbedingte Mutationen durch verschiedene molekulare Prozesse entstehen.

- Abweichend von der rad2-18 Mutante (v. BORSTEL et al. 1971) und Endonuklease-defekten Bakterien-Stämmen, die dieselbe

spontane Mutationsrate wie der Wildtyp zeigen, ist bei der rad2-20 Mutante die spontane ADE-Mutation um mehr als das Doppelte erhöht. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß aufgrund des wenig leistungsfähigen Betriebsstoffwechsels der Mutante eine Funktion gestört wird, die nichts mit der rad2-20 Mutation zu tun hat.

- Es konnte das Ergebnis von MOUSTACCHI (1971) bestätigt werden, daß das RAD2 Gen in geringem Maße an der Reparatur der Mitochondrien-DNS beteiligt ist.

Ein wichtiges Ziel der Arbeit lag darin, weitere Information darüber zu erhalten, welche Reparaturschritte durch die r^s_1 bzw. r^s_2 Mutation blockiert sein könnten.

Eine eindeutige Identifizierung der Gene im Rahmen des RAD-Systems war bisher noch nicht möglich. Allerdings ist eine Zuordnung zu einem bestimmten Reparatursystem bei Hefen schwierig, da es noch nicht gelungen ist, die außer dem Excision Repair System vermuteten beiden weiteren Reparatursysteme genauer zu charakterisieren, geschweige denn in allen drei Systemen die enzymatischen Schritte und die zugehörigen, kontrollierenden RAD Gene zu analysieren.

Es können folgende Aussagen gemacht werden:

- Da die UV-Sensibilität der r^s_1rad2-20 bzw. r^s_2rad2-20 Doppelmutante einen geringen Unterschied zu der der rad2-20 Mutante (DRF 1, 8) zeigt, bzw. gleiche Sensibilität wie die Vierfachmutante von GAME und COX (1972), erscheint es wahrscheinlich, daß alle drei Gene Schritte des Excision Repair Systems kontrollieren.
- Die gegenüber dem Wildtyp erhöhte Letalität, aber unveränderte UV-Mutabilität der r^s_1 und r^s_2 Mutante läßt sich mit der Hypo-

these erklären, daß die beiden fraglichen Gene einen Schritt nach dem Ausschneiden der Dimere kontrollieren. Eine defekte Polymerase oder Ligase würde zwar die Überlebenschance mindern, wenn z.B. durch langsame Reparatur der "gaps" oder "nicks" die Exonukleasetätigkeit gefördert und die DNS in erhöhtem Maße degradieren würde.
Da diese Enzyme keinen Einfluß auf die Zahl der nicht ausgeschnitteten Schäden, die die Höhe der Mutationsrate bestimmt, haben, bliebe die Mutabilität unverändert.

- Die gegenüber dem Wildtyp geringfügig, jedoch signifikant erhöhte spontane Mutationsrate zur ADE-Prototrophie würde dafür sprechen, daß beiden Genen eine Funktion bei der DNS-Replikation zukommt.
Ein vergleichbares Verhalten zeigt auch die polA$^-$ Mutante der Bakterien. Von OKAZAKI et al. (1971) wurde nachgewiesen, daß die Kornberg-Polymerase bei der Verknüpfung der einzelnen DNS-Stücke der Replikation ("OKAZAKI-Stücke") eine Rolle spielt.

- Die hohe spontane und UV-induzierte Mutabilität zur Atmungsdefizienz der r^s_1 Mutante weist auf eine Beteiligung des R^s_1 Genproduktes an den Reparaturprozessen an mitochondrialer DNS hin.

- Die von AVERBECK (1970) beschriebene Rö-Sensibilität und die von LASKOWSKI und LEHMANN-BRAUNS (1973) beschriebene Sensibilität gegen alkylierende Agentien der r^s_1 und r^s_2 Mutante lassen sich durch eine Polymerase- oder Ligasemutation erklären. Die entsprechenden Bakterienmutanten, polA$^-$ und die temperatursensible Ligasemutante sowie die temperatursensiblen Ligasemutanten von Saccharomyces zeigen ebenfalls UV- und Rö-Sensibilität.

Die bisher kurz zusammengefaßten Eigenschaften stehen nicht im Widerspruch zu der Hypothese, daß in der r_1^s und r_2^s Mutante Enzyme geschädigt sind, die am Excision Repair beteiligt sind.

Es soll jedoch auch erwähnt werden, daß die Mutanten Eigenschaften besitzen, die nicht so leicht mit dem vorgeschlagenen Modell zu erklären sind:

1. Das Sporulationsverhalten der homozygoten Diplonten (AVERBECK 1970).
   Der $r_1^s r_1^s$ Diplont sporuliert nicht, der $r_2^s r_2^s$ Diplont sporuliert normal. Da nachweislich die r_1^s Mutation erheblichen Einfluß auf die Atmungskompetenz hat (Kap. 3.5), kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Sporulationsdefekt durch die r_1^s Mutation nur indirekt über den Energiehaushalt der Zelle bedingt ist. Atmungsdefekte Hefezellen sporulieren nicht (KRAEPELIN 1967).

2. Die mitotische intergenische Rekombination der homozygoten Diplonten (KOWALSKI, unveröffentlicht).
   Der $r_1^s r_1^s$ Diplont rekombiniert wesentlich häufiger als der Wildtyp, der $r_2^s r_2^s$ Diplont rekombiniert überhaupt nicht.

   Das Verhalten des $r_1^s r_1^s$ Diplonten könnte durch die Hypothese, daß ein Defekt der Reparatursynthese vorliegt, erklärt werden: Nach neuen Modellen, die auf dem EMBO-Workshop "Molecular Basis of Genetic Recombination", Aviemore, Schottland (1973), entwickelt und in der Form noch nicht veröffentlicht sind, wirken sich "gaps" bzw. "nicks" und dadurch vorhandene DNS-Einzelstrang-Enden auslösend für ein Rekombinationsereignis aus. Wenn in der $r_1^s r_1^s$ Mutante die Stranglücken länger offenbleiben als im Wildtyp, könnte sich die Chance für ein Rekombinationsereignis erhöhen.
   Die total unterbundene mitotische Rekombination der $r_2^s r_2^s$ Mutante ist nach diesem Modell nicht so einfach zu erklären.

Es sollte erwähnt werden, daß die temperatursensiblen strahlensensiblen Ligasemutanten (BANDAS et al. 1973) sich untereinander hinsichtlich der UV- und Rö-Sensibilität ähnlich verhalten, aber unterschiedliche mitotische Rekombinationshäufigkeit zeigen. Eine Mutante rekombiniert häufiger, 3 Mutanten seltener als der Wildtyp nach UV-Bestrahlung.

3. Das unterschiedliche Verhalten der r_1^s und r_2^s Mutante bei Röntgenbestrahlung unter Sauerstoff- bzw. Stickstoffatmosphäre (AVVERBECK und EBERT, 1972, 1973).

Eine eindeutige Entscheidung über die Zugehörigkeit des R_1^s und R_2^s Gens kann also nicht getroffen werden.
Der bisher vertretenen und begründeten Vorstellung, daß die drei Strahlensensibilität verursachenden Gene in drei verschiedene Reparatursysteme einzuordnen sind (AVERBECK 1970, AVERBECK und EBERT 1972, 1973, LASKOWSKI und LEHMANN-BRAUNS 1973), läßt sich das ebenfalls zu begründende Modell entgegensetzen, daß zumindest auch das R_1^s Gen Excision Repair kontrolliert. Die Einordnung des R_2^s Gens bleibt unsicher.

Welche Enzyme in den betreffenden Stämmen defekt sind , kann nur durch biochemische Untersuchungen geklärt werden.
Es müßte u.a. die Fähigkeit zum Ausschneiden von Dimere, die Kinetik der Reparatursynthese und DNS-Degradierung untersucht werden, die bei Bakterien die Polymerase-Mutation bestätigen konnten.
Dennoch soll in der Tabelle 8 verglichen werden, in welchen phänotypischen Eigenschaften sich die vermeintlich Polymerase- oder Ligase-defekten Hefemutanten mit den entsprechenden Bakterienmutanten vergleichen lassen.

In welchem Reparatursystem das betreffende Enzym arbeitet, bzw. ob

Tabelle 8: Vergleich der r_1^s und r_2^s Mutante mit Polymerase- und Ligase-defekten Mutanten bei E. coli

phänotypische Eigenschaften	r_1^s Mutante	r_2^s Mutante	polA⁻ (E. coli)	temperatursensible Ligase-Mutante (E. coli)
UV-Sensibilität	mittel DRF 3, 16	mittel DRF 2, 6	mittel DRF ca. 5 (GROSS und GROSS 1969, KANNER et al. 1970, BOYLE et al. 1970)	mittel DRF 2, 7 (PAULING und HAMM 1968)
Röntgen-Sensibilität	leicht sensibel DRF 1, 6 (LASKOWSKI et al. 1968)	leicht sensibel DRF 1, 6 (AVERBECK 1970)	sehr sensibel DRF 6, 5 (TOWN et al. 1971)	leicht sensibel DRF 1, 9 (DEAN und PAULING 1970)
Sensibilität der Doppelmutante	r_1^s rad2-20 DRF 1, 8 gegen rad2-20	r_2^s rad2-20 DRF 1, 8 gegen rad2-20 (AVERBECK 1970)	uvrA⁻polA⁻ nur geringer Sensibilitätsunterschied zu uvrA⁻ (GROSS et al. 1971)	weitere vergleichbare Daten sind nicht vorhanden
UV-induzierte Mutationsrate BPS AD-DEL	= Wildtyp > Wildtyp (?)	= Wildtyp > Wildtyp (?)	= Wildtyp > Wildtyp (KONDO et al. 1970, WITKIN 1972, ISHII und KONDO 1972, KONDO 1973)	
Spontane Mutationsrate	> Wildtyp	> Wildtyp	> Wildtyp (ISHII und KONDO 1972)	
Spontane und UV-induzierte Mutationsrate atmungsdefekter Mutanten	> Wildtyp	> Wildtyp		
Mitotische intergenische Rekombination	> Wildtyp (KOWALSKI unveröffentlicht)	——	= Wildtyp (GROSS und GROSS 1969)	

es eine bestimmte enzymatische Funktion nicht auch in mehreren Reparatursystemen wahrnehmen kann, kann endgültig nur durch genetische Analyse gemeinsam mit der großen Zahl weiterer Strahlensensibilität verursachender Gene vorgenommen werden.

4.4 Kinetik der UV-induzierten Mutagenese

Während im vorherigen Kapitel aus dem Mutationsverhalten der sensiblen Mutanten Rückschlüsse auf die Beteiligung von bestimmten Reparaturenzymen an dem Mutationsprozeß gezogen wurden, sollen in diesem Kapitel die Mutationsvorgänge als Indiz für die Arbeitsweise von Reparaturprozessen gewertet werden.
Die Abhängigkeit der Mutationsrate von der UV-Dosis soll vereinfachend als Mutationskinetik bezeichnet werden.
Diese Bezeichnung erscheint berechtigt, da durch die Kurven die Reaktion mutagen wirkender Reparaturenzyme mit ihrem Substrat, den UV-Schäden, anhand der "Reaktionsprodukte", nämlich den Mutationsereignissen in der Zelle, beschrieben wird.

4.4.1 Methodisches zur Untersuchung der Mutationskinetik

Wenn die Abhängigkeit der UV-induzierten Mutationsrate zu der induzierenden UV-Dosis durch die Funktion $y = a \cdot x^n$ beschrieben werden kann, ergibt sich bei doppeltlogarithmischer Auftragung eine Funktion $y' = a' + n \cdot x'$ (siehe Kap. 2.6.4.2).

Wenn der Exponent n der Funktion eine Konstante, d.h. dosisunabhängig,ist, läßt sich der Zusammenhang zwischen der Mutationsrate und der UV-Dosis in doppeltlogarithmischem Raster durch eine Gerade beschreiben; wenn der Exponent n jedoch variabel, d.h. selber abhängig von der UV-Dosis ist, erfüllen die Wertepaare in doppeltlogarithmischer Auftragung eine nicht lineare Funktion.

Aus den Abbildungen 8 bis 12 geht hervor, daß die Mutationsraten des Wildtyps und der r_1^s und r_2^s Mutante bei doppeltlogarithmischer Auftragung einer Gerade zuzuordnen sind, während sich bei entsprechender Auftragung der rad2-20 Mutante eine hyperbelartige Dosisabhängigkeit ergibt. In Abb. 40 und 41 sind zur Übersicht die Mutationskurven aller Stämme zusammengefaßt.

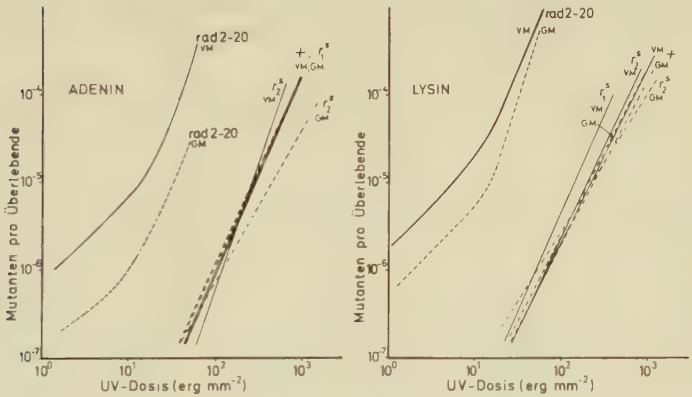


Abb. 40 und 41:

Zusammenfassung der Ausgleichsgeraden bzw. -kurven für die ADENIN- und LYSIN-Mutationsraten des Wildtyps und der sensiblen Mutanten (r_1^s, r_2^s, rad2-20) bei GM- und VM-Anzucht in Abhängigkeit von der UV-Dosis.

Die Kurven sind aus den Abb. 8 bis 12 und 24 bis 27 übernommen.

Aus dem Anstieg der Geraden kann für den Wildtyp und die mittelsensiblen Stämme der Grad der Funktion berechnet werden, mit dem die UV-induzierte Mutationsrate von der Dosis abhängig ist. Für die rad2- Stämme werden die Grenzwerte des variablen Exponenten n bestimmt durch den Anstieg der Hyperbeläste.
Die für die verschiedenen Stämme gültigen Exponenten der Mutationsfunktionen sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Übersicht über den Grad der Funktion, die die Abhängigkeit der UV-induzierten Mutationsrate von der induzierenden UV-Dosis beschreibt, bei dem Wildtyp und den sensiblen Mutanten im Vergleich.

Stamm	Gen	ADE-Mutation		LYS-Mutation	
		VM-Anzucht	GM-Anzucht	VM-Anzucht	GM-Anzucht
235-11c	+	2, 23	1, 88	2, 04	2, 18
2110-222	r^s_1	2, 30	2, 19	2, 31	1, 94
2121-140	r^s_2	3, 00	1, 72	2, 18	1, 56
2104-56	rad2-19	2, 78		1, 00 → 1, 45	
2105-15	rad2-20	1, 00 → 2, 50	0, 62 → 2, 00	1, 00 → 2, 50	1, 00 → 2, 90

Dabei ergibt sich, daß in sehr niedrigen Dosisbereichen (bis ca. $10\ erg\ mm^{-2}$) bei den rad2 Mutanten ein Exponent n = 1 vorliegt (Ausnahme: ADE-Mutationsrate einer GM-Population), d.h. also eine Proportionalität von der Mutationsrate zu der induzierenden Dosis. Bei ca. $10\ erg\ mm^{-2}$ macht sich die dosisabhängige Änderung des Exponenten n deutlich bemerkbar. Der durch die experimentellen Werte erfaßbare Grenzwert von n liegt zwischen 2 und 3.

Das Mutationsverhalten läßt sich deshalb für den Wildtyp und den r_1^s und r_2^s Stamm in seiner Abhängigkeit von der UV-Dosis durch die Gleichung

$$m_D = a' \cdot D^n$$

und das Verhalten der rad2 Mutanten näherungsweise durch die Gleichung

$$m_D = a \cdot D + b \cdot D^n$$

beschreiben, wobei n einen konstanten, für jeden Stamm und Mutationstyp charakteristischen Wert einnimmt. Ein aus allen Exponenten des Dosisbereichs > 10 erg mm^{-2} gemittelter Wert $\bar{n} = 2,18$ weist auf eine annähernde quadratische Dosisabhängigkeit der Mutationskinetik.

Interessant ist die Frage, worin die biologischen Ursachen zu sehen sind für das Verhalten der Stämme , das sich in den mathematischen Aussagen fassen läßt.
Es gilt also, ein Modell zu finden, das die quadratische Mutationskinetik, die offenbar "Normalfall" ist und in den meisten Dosisbereichen gilt, erklärt und das gleichzeitig eine Deutung für den Übergang einer linearen in eine quadratische Funktion möglich macht, wie er bei den rad2 Mutanten zu finden ist.

Es sollte darauf hingewiesen werden, daß bei Bakterien eine quadratische Abhängigkeit der UV-induzierten Mutationsrate von der induzierenden Dosis häufig gefunden und als typisch für UV-induzierte Mutation angesehen wird, jedoch bei den verschiedenen Autoren unterschiedliche Erklärungen findet, (WITKIN 1956, 1961, 1969; BRIDGES et al. 1967b, 1968, a,b; KONDO et al. 1970, KONDO 1973).

Ebenso ist bei manchen Mutationssystemen eine hyperbelartige Abhängigkeit bei doppeltlogarithmischer Auftragung der Mutationsraten über der Dosis des induzierenden Agens gefunden worden. Beschrieben wurde dies bei der Mutationsinduktion durch Röntgenstrahlen (KELLERER und HUG 1972), durch diverse Chemikalien (AUERBACH und RAMSAY 1970a, b; KILBEY 1973a,b; WILD 1973) und bei durch Röntgenstrahlen induzierten Carcinomen (ROSSI und KELLERER 1972).

Die dosisabhängige Änderung der Mutationskinetik der rad2 Mutanten scheint jedoch die rad2 Mutation zur Ursache zu haben, zumindest aber durch diese Mutation sichtbar gemacht zu werden, da durch die sensible Mutante ein Dosisbereich untersucht werden kann, der in einem resistenten Stamm kaum erfaßbar ist. So ist es für die Interpretation der Mutationskinetiken von Nachteil, daß für den Wildtyp und die mittelsensiblen Stämme in dem Dosisbereich von 10 erg mm^{-2} keine Mutationswerte vorliegen und experimentell auch recht schwierig zu gewinnen sind, da man in dem Bereich spontaner Mutabilität liegt. Es ist nicht zu unterscheiden, ob die Dosisabhängigkeit des Exponenten ein für die rad2 Mutante typisches Verhalten ist, oder ob es ein für das Mutationsgeschehen bei Hefen typischer Vorgang ist. Da in der rad2 Mutante das Excision Repair System nicht arbeitet, bietet dies die Möglichkeit, mit Hilfe des Mutationsverhaltens der Mutante das "fehlerhaft arbeitende" Reparatursystem zu charakterisieren, das funktionsfähig sein sollte.

4.4.2 Modellvorstellungen zur Erklärung der quadratischen Mutationskinetik

Die proportionale Abhängigkeit der Mutationsrate von der Dosis ist durch das klassische Modell der Treffer-("hit") bzw. Treffbereich ("target") -Hypothese relativ einfach zu erklären.

Entweder ist die Voraussetzung für das Entstehen einer Mutation ein Treffer, d.h. ein bestimmter UV-Schaden, oder die Veränderung eines bestimmten Genbereichs, des sog. Treffbereichs. In beiden Fällen wächst die Wahrscheinlichkeit für das jeweilige Geschehnis proportional mit der Dosis, so daß die Mutationsrate proportional mit der Dosis zunimmt.

Wenn die Mutationsrate nicht linear von der Dosis abhängig ist, bedeutet dies für die biologischen Ursachen, daß nicht die Abhängigkeit von einem einzigen "Faktor" zugrundeliegt, sondern das vermutlich komplizierte Zusammenwirken verschiedener "Faktoren". Worin diese "Faktoren" bestehen können, darin unterscheiden sich die verschiedenen Modelle, die den quadratischen Zusammenhang von Mutationsrate und induzierender UV-Dosis erklären wollen.

1. "Multi target" Modell

Entsprechend der "multi target" Hypothese für die Interpretation von nicht exponentiellen DEK wird angenommen, daß es mehrere Treffbereiche gibt, deren jeweilige Veränderung dieselbe phänotypische Mutation hervorbringt.
Mit diesem Modell konnten MAROUDAS und WILKIE (1968) die Unterschiede in der Kinetik der Induktion atmungsdefekter Mutanten erklären, da je nach physiologischem Zustand der Zelle eine unterschiedliche Zahl an "master templates", genetisch maßgeblichen Mitochondrien-DNS-Copien existieren, durch deren Veränderung eine Mutation zur Atmungsdefizienz resultiert.
ROSSI und KELLERER (1972) interpretieren die Ergebnisse der Röntgenstrahl-induzierten Carcinogenese, bei der sie bei doppeltlogarithmischer Auftragung der Induktionsrate von Carcinomen über der Dosis Werte von $n < 1$ erhalten, in der Weise, daß zur Entstehung eines Carcinoms nicht eine einzige sensible Zelle, sondern das Zusammenwirken mehrerer transformierter Zellen nötig ist.

Wenn man das Modell auf die Kernmutation anwenden will, könnte man die einzelnen Gene, durch deren Veränderung eine Mutante entstehen kann, als target ansehen. Damit wäre zu fordern, daß für Locusmutationen $n = 1$, für Suppressormutationen $n > 1$ werden sollte, da verschiedene Suppressorgene für einen Mutantentyp existieren. Tatsächlich finden BRIDGES et al. (1967a) für Locusmutanten $n = 1$, für Suppressormutanten dagegen $n = 2$.

Bei den untersuchten Stämmen läßt sich jedoch beweisen, daß die experimentell ermittelte Kinetik stammspezifisch ist. In den Abbildungen 42 und 43 sind für den Wildtyp und die rad2-20 Mutante die Locus- und Suppressorraten doppeltlogarithmisch über der UV-Dosis aufgetragen. Aus den Zeichnungen ist ersichtlich, daß im Wildtyp beide Mutationstypen eine annähernd quadratische Kinetik zeigen, in der rad2-20 Mutante beide den Übergang von einer linearen zu einer quadratischen Kinetik.

2. "Multi hit" Modell

Nach KELLERER und HUG (1972) wird das "Zwei Treffer" Modell zur Erklärung der Röntgenstrahl-induzierten Mutation herangezogen, und zwar derart, daß eine lineare Kinetik durch die Spur eines Quants, die quadratische durch das Zusammenwirken der Energiespuren von zwei Quanten erklärt wird.

Eine variierte Form dieses Modells formulieren BRIDGES (1966) und MENNIGMANN (1972), die zur Entstehung von einem Mutationsereignis das Zusammenwirken von zwei Schadenstypen fordern.

Dabei unterscheiden sich die Vorstellungen, wie das Zusammenwirken aussieht:

a. MENNIGMANN fordert das räumliche Zusammentreffen und demzufolge Zusammenwirken bei der Mutationsentstehung von zwei Schäden A und B, die durch ihre Photoreaktivierbarkeit

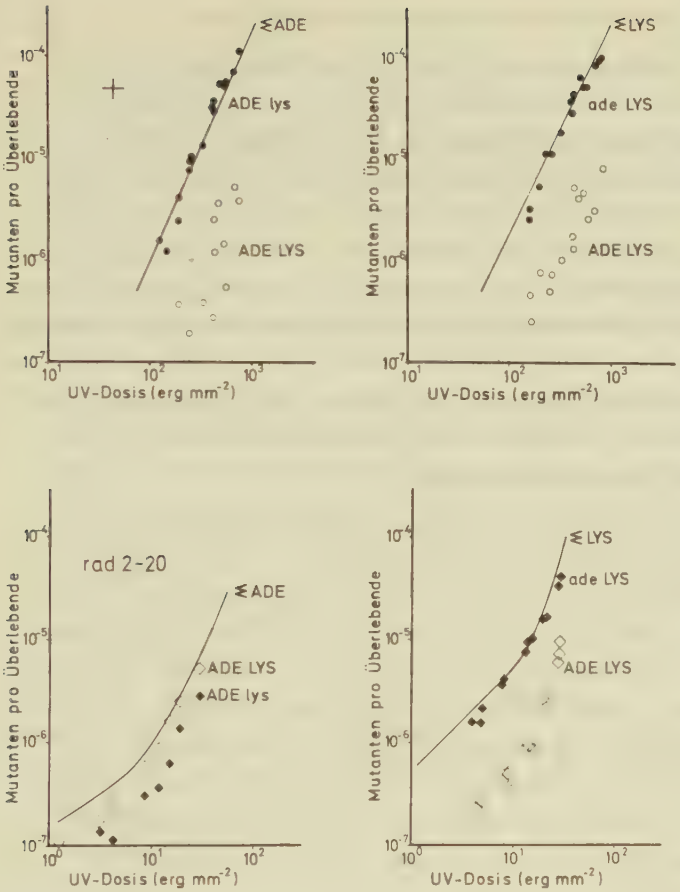


Abb. 42 und 43:

Doppeltlogarithmische Auftragung der UV-induzierten ADENIN- und LYSIN-Locus- bzw. Suppressormutationsrate (ADE lys, ade LYS bzw. ADE LYS) über der UV-Dosis bei dem Wildtyp (+) und der rad2-20 Mutante.
Die ausgefüllten Symbole kennzeichnen die Locusmutation, die hohlen die Suppressormutation. Jedes Symbol entspricht einem experimentell ermittelten Wert.
Die ADENIN- und LYSIN-Mutationskurven (Σ ADE und Σ LYS) entsprechen bei dem Wildtyp den Kurven in Abb. 8, bei der rad2-20 Mutante den Kurven in Abb. 27.

und Entstehungsbedingungen charakterisiert sind.

Mit dieser Hypothese ist der Wechsel in der Kinetik der rad2-20 Mutante schwierig zu erklären. Aufgrund der Reparierfähigkeit des Wildtyps und der mittelsensiblen Stämme sollte bei ihnen bei höherer Dosis dieselbe Schadensverteilung auftreten wie in dem hochsensiblen Stamm bei niedriger Dosis. Das bedeutet aber, daß bei UV-Dosen, die durch den jeweiligen DRF des Stammes zu bestimmen sind, auch bei den resistenteren Stämmen ein Wechsel in der Kinetik zu erwarten wäre, was jedoch eindeutig nicht der Fall ist. Daraus muß geschlossen werden, daß die "akuten", d.h. nicht reparierten Schäden an der DNS offenbar keinen Einfluß auf den Wechsel in der Mutationskinetik haben.

b. BRIDGES postuliert zwei Schadenstypen, von denen nur der eine mutagen sein soll, der andere als mit ihm kompetitierendes Substrat für das Reparaturenzym wirkt.
Auch hier treten Schwierigkeiten in der Erklärung der quadratischen Kinetik auf. Wenn A und B beide proportional mit der Dosis entstehen und um das Reparaturenzym konkurrieren, sollte der nicht reparierte Anteil an Schäden nur dann eine nicht lineare Abhängigkeit von der Dosis zeigen und damit eine nicht lineare Mutationsrate bedingen, wenn die Reparaturintensität dosisabhängig ist. Das aber ist die Hypothese von Modell 3.

3. Modell der dosisabhängigen Reparatureffektivität

In diesem Modell wird die Vorstellung vertreten, daß in verschiedenen Dosisbereichen unterschiedliche Reparatur wirksam wird, und zwar kann dies bedeuten:

a. quantitativ unterschiedlich,
d.h. über den gesamten Dosisbereich arbeitet dasselbe Repa-

ratursystem, jedoch mit dosisabhängiger Effektivität

b. qualitativ unterschiedlich
d.h. in den unterschiedlichen Dosisbereichen sind verschiedene Systeme am Werk, die außerdem auch noch dosisabhängig arbeiten können.

Für dosisabhängige Reparatur, die sich z.B. im Kurvenverlauf einer DEK äußern kann, werden in der Literatur verschiedene Beispiele angeführt:

- TYRRELL et al. (1972) und RADMAN et al. (1970) interpretieren die starke Schwanzbildung in einem $uvr^{-}rec^{+}$ Stamm von E.coli durch dosisabhängige Reparaturtätigkeit.
  Auch bei dem sensiblen UVS 1, 1 Schizosaccharomyces Stamm (FABRE 1971) findet sich dieser deutliche Schwanzeffekt und wird ähnlich interpretiert. Es sei daran erinnert, daß auch die rad2-20 und r^{s}_{1} Mutante deutliche Schwänzung zeigen.
- COX und PARRY (1968) und PARRY und PARRY (1973) beschreiben DEK von sensiblen Saccharomyces-Mutanten, bei denen auf einen sehr steilen Abfall bis auf 1%ü ein Anstieg auf mehr als 10%ü und danach ein allmählicher Abfall erfolgt. Ein ähnliches Phänomen zeigt sich auch bei der DEK röntgenbestrahlter Tetrahymena (CALKINS 1967).

In welcher Weise könnte die Mutationskinetik durch dosisabhängige Reparatur beeinflußt werden?
Nach dem allgemein diskutierten Mutationsmodell ist für die Entstehung von Informationsänderungen in der DNS, die für das Zustandekommen von Mutationsereignissen Grundbedingung sind, Voraussetzung:

- primäre UV-Schäden, die in proportionaler Abhängigkeit von der UV-Dosis gebildet werden,

- fehlende Reparatur dieser Schäden durch das EXC-System,
- Umwandlung der Primärschäden in die eigentlich mutativen Veränderungen durch ein weiteres, fehlerhaft arbeitendes Reparatursystem.

Wenn also die dosisabhängige Reparatur die Ursache dafür sein soll, daß die Mutationsrate in einer nicht linearen Abhängigkeit zu der induzierenden UV-Dosis steht, obwohl die primären UV-Schäden proportional mit der Dosis gebildet werden, so ergeben sich zwei Möglichkeiten der Beeinflussung:

1. dosisabhängige Zerstörung des "EXC-Systems"
2. dosisabhängiger Aufbau (Induktion oder Aktivierung) des fehhaft arbeitenden Reparatursystems.

1. Zerstörung des Excision Repair Systems

Die Zerstörung durch das mutagene Agens hat zur Folge, daß die Mutationsrate nicht linear mit der Dosis steigt: dem fehlerhaft arbeitenden Reparatursystem wird mit wachsender Dosis immer mehr Substrat angeboten, das mit bestimmter Wahrscheinlichkeit in eine mutagene Änderung umgewandelt wird.

Für diesen Vorgang gibt es bei der Induktion zur Adenin-Prototrophie durch Diepoxybutan (DEB) bei Neurospora Beweise:
Bereits AUERBACH und RAMSAY (1970a, b) äußern die Vermutung, daß die durch DEB verursachte sehr hohe ADE-Mutationsrate auf einer doppelten Wirkung des DEB beruht: einerseits werden an der DNS mutagene Schäden verursacht und andererseits wird einer der zellulären Prozesse beeinflußt, die bei der Expression der Mutante beteiligt sind. Vorbehandlung mit kleinen Dosen DEB vor UV-Bestrahlung oder der eigentlichen DEB-Behandlung erhöht die Mutationsrate erheblich und macht es wahrscheinlich, daß durch DEB ein Reparaturenzym geschädigt wird, das praemutative Schäden aus

der DNS entfernt. Einen direkten Beweis für diese Hypothese erbrachte KILBEY (1973a, b). Er erzielte bei niedriger DEB-Konzentration durch Blockierung der Proteinsynthese mittels Actidion eine quadratische Mutationskinetik, während normalerweise in dem entsprechenden Konzentrationsbereich eine lineare Dosis-Effekt-Beziehung auftritt. Dieses Phänomen interpretiert er so, daß bei niedrigen DEB-Konzentrationen die Neubildung von Reparaturenzym zum Ersatz des durch DEB inaktivierten Enzyms noch ausreicht, daß jedoch mit zunehmender DEB-Dosis die geschädigten Enzymmoleküle nicht ersetzt werden können, und die lineare Mutationskinetik von einer quadratischen abgelöst wird. Bei Blockierung der Proteinsynthese kann kein geschädigtes Reparaturenzymmolekül ersetzt werden, demzufolge findet sich bereits bei niedrigsten DEB-Dosen eine quadratische Mutationskinetik.

Es erhebt sich die Frage, ob dieses Modell auf UV-Strahlen als mutagenes Agens übertragbar ist. Grundsätzlich ist eine Inaktivierung von Enzymen durch UV-Bestrahlung möglich, da bei neutralem und alkalischen pH die molare Absorption und die Wahrscheinlichkeit für eine dadurch ausgelöste chemische Reaktion bei einer Strahlung von 254 nm bei Aminosäuren und demzufolge Proteinen nicht unbedeutend ist. Am empfindlichsten gegen UV-Strahlen ist die S-S-Bindung des Cystins, gefolgt von den aromatischen Aminosäuren (SMITH und HANAWALT 1969).

Problematisch ist die Anwendung des Modells zur Erklärung des Verhaltens der rad2 Mutanten, da diese Stämme gerade in dem System, das die praemutativen Schäden entfernt, defekt ist. Wenn man jedoch annimmt, daß das durch die rad2 Mutation veränderte Enzym noch eine geringe Funktionsfähigkeit besitzt, wäre denkbar, daß bereits durch geringe Energiemengen eine weitere, erhebliche Veränderung der Struktur und erhöhte Funktionsunfähig-

keit einträte, die bei den übrigen Stämmen erst bei weitaus höheren Dosen beginnt.
Auch HAYNES (1966) vermutet als möglichen Grund für den exponentiellen Abfall der DEK nach dem Schulterbereich die Inaktivierung eines Reparaturenzyms.

2. Induktion eines fehlerhaft arbeitenden Reparaturenzyms

Dieser Mechanismus hat im Prinzip ähnliche physiko-chemische Grundlagen wie der vorher diskutierte. Man könnte annehmen, daß nicht das Reparaturenzym durch die UV-Strahlung zerstört wird, sondern daß ein Repressormolekül, das die Synthese des betreffenden Reparaturenzyms reprimiert, zerstört oder durch eine Konformationsänderung bindungsunfähig gemacht wird. Da die UV-Sensibilität der Aminosäuren eines Proteins unterschiedlich ist (SMITH und HANAWALT 1969), ist es durchaus denkbar, daß durch UV-Absorption und folgende chemische Reaktion einer oder weniger Aminosäuren eine Konformationsänderung eines Proteinmoleküls möglich wird.

Ansätze zu einem experimentellen Nachweis der Induktionshypothese bieten sich dadurch, daß Proteinsynthese zur Bildung des Reparaturenzyms nötig ist und demzufolge Hemmung der Proteinbiosynthese nach Bestrahlung zu einer Sensibilisierung führen sollte. Noch bevor das Recombination Repair System neben dem Excision Repair System, das auf Proteinsynthese nicht angewiesen ist, in Bakterien bekannt wurde, gab es bereits einige Beispiele dafür, daß Proteinsynthese für die Reparatur von Strahlenschäden nötig ist.

Wesentlich direktere Argumente für die Induzierbarkeit von Reparaturenzymen in Bakterien brachte die Untersuchung von Induktionsvorgängen an Bakteriophagen. Es ist auffallend, daß für die UV-

Induktion des Lambda-Prophagen (MONK et al. 1971), UV-Reaktivierung und UV-Mutagenese von bestrahlten Lambda-Phagen (DEFAIS et al. 1971, FAUQUET und DEFAIS 1972) sowie für Mutation und Rekombination der Bakterien selber (MIURA und TOMIZAWA 1968, DONCH et al. 1970, DEFAIS et al. 1971), jeweils die rec^+ und exr^+ Funktionen gebraucht werden. In rec^+uvr^- bzw. exr^+uvr^- Bakterien erfolgt die Reaktivierung von bestrahlten Phagen jedoch nur dann, wenn die Bakterien selber UV-Schäden in ihrer DNS besitzen, d.h. selber bestrahlt wurden (MEYN et al. 1969). Diese Ergebnisse weisen deutlich auf die Induktion der entsprechenden Bakterienfunktionen durch die Bestrahlung hin.

Zur Erklärung des Mutationsverhaltens der $polA^-$ Mutante griffen WITKIN und GEORGE (1973) diese Überlegungen auf und postulierten, daß eine mutative Veränderung in Bakterien-DNS nur durch ein funktionsfähiges, durch Bestrahlung induziertes Reparatursystem, das sog. "SOS-System", möglich ist. Die Induktion dieses Systems erfordert die rec^+ und exr^+ Funktionen. Es gibt Hinweise dafür, daß ca. 5% der $recA^+$ Funktion konstitutiv ist und eine fehlerfreie Reparatur kontrolliert (WITKIN und GEORGE 1973).

Da die Kurven für die Induktion des Lambda-Prophagen in der uvr^- und $polA^-$ Mutante in Abhängigkeit von der UV-Dosis identisch sind, folgerten WITKIN und GEORGE (1973), daß nicht ausgeschnittene Pyrimidindimere (im uvr^- Stamm) und verlängert offenbleibende "excision gaps" (in der $polA^-$ Mutante) in gleicher Weise induzierend wirken. So wird bei der $polA^-$ Mutante das "SOS-System" bei niedrigerer Dosis induziert als im Wildtyp, womit die bei niedrigen UV-Dosen gegenüber dem Wildtyp erhöhte Mutationsrate der $polA^-$ Mutante begründet wird.
Die höhere Sensibilität der $polA^-$ Mutante wird darauf zurückgeführt, daß aufgrund der offenbar verlangsamten Reparatursynthese nach dem Ausschneiden der Pyrimidindimere fehlerhaft transkribiert wird und demzufolge ein zunehmender Anteil der induzierten En-

zymmoleküle funktionsgestört ist.
Mit Hilfe des induzierbaren, fehlerhaft arbeitenden Reparatursystem erklären WITKIN und GEORGE auch die quadratische Mutationskinetik, da mit zunehmender Dosis ein zunehmender Anteil an UV-Schäden durch dieses System repariert wird. Sie vermuten, daß bei höheren Dosen ein erneuter Übergang zu einer linearen Abhängigkeit der Mutationsrate von der Dosis erfolgt, da die Induktion des Enzyms nicht unbegrenzt andauert. DOUDNEY und YOUNG (1962) fanden dies bereits bei der Mutation zur Prototrophie von E.coli WP2.

An Ustilago lieferte HOLLIDAY (1971) einen direkten biochemischen Beweis, daß Reparatur, die mittels eines Rekombinationsereignisses erfolgt, auf einen Induktionsvorgang zurückgeht. Er zeigte, daß mitotische Rekombination nach Bestrahlung viel häufiger auftritt als spontan, und zwar nur in den überlebenden und nicht den toten Zellen. Bei Hemmung der Proteinsynthese nach Bestrahlung wird die Rekombination, die Reparaturfunktion hat, unterbunden.

4.4.3 Induktion eines Reparatursystems bei Hefen?

Für den Fall, daß das Modell der Induktion eines Reparatursystems auch bei Hefen Anwendung finden kann, könnte man sowohl die quadratische Mutationskinetik bei höheren Dosen in dem resistenten Wildtyp und den mittelsensiblen Stämmen als auch den Wechsel in der Kinetik in den hochsensiblen Mutanten recht gut erklären:
Bei dem Wildtyp und dem r_1^s und r_2^s Stamm ist der Dosisbereich erfaßt, in dem die Induktion eines Reparaturenzyms erfolgt und somit eine zunehmende Zahl an Primärschäden in mutativen Veränderungen fixiert werden.
Bei den rad2 Mutanten ist offenbar auch der Schwellenbereich erfaßt, in dem sich die Induktion des Enzyms allmählich bemerkbar macht.
Es ist nicht bekannt, ob das fehlerhaft arbeitende REV System mit

dem induzierbaren Reparatursystem gleichzusetzen ist.

Allerdings bleibt zweierlei problematisch:

- Was wirkt induzierend?
  Im Gegensatz zu der Annahme von WITKIN und GEORGE (1973) können bei Hefen nicht die nicht reparierten UV-Schäden an der DNS induzierend wirken. Wie bereits diskutiert wurde, wären dann beim Wildtyp und den mittelsensiblen Stämmen bei geringeren UV-Dosen ebenfalls lineare Kinetiken zu erwarten.
  Man könnte annehmen, daß die Induktion durch die absorbierte Energie bewirkt wird.
- Durch welchen Mechanismus entstehen die Mutanten im niedrigen Dosisbereich in den rad2 Mutanten?
  Da in diesem Bereich Photoreaktivierbarkeit nachweisbar ist, müssen an der Entstehung der Mutanten Pyrimidindimere beteiligt sein, die nach bisherigen Vorstellungen nur mittels aktiver Reparatur in mutative Veränderungen umgewandelt werden können.
  Entweder sind kleine Mengen des Enzyms in den Zellen ohne Bestrahlung bereits vorhanden, oder es gibt noch einen weiteren, in geringerem Maße benutzten Mechanismus der Mutagenese.

Vorläufig ist das Modell eines durch UV-Bestrahlung induzierten Reparatursystems, das an der Entstehung von mutativen Veränderungen in der DNS beteiligt ist, bei Hefen noch sehr hypothetisch. Allein durch die Interpretation der Mutationskinetik scheint die Postulierung der Induktion des Systems nicht gerechtfertigt zu sein, da diese Effekte auch durch Zerstörung des EXC-Systems durch die UV-Bestrahlung erklärt werden könnten. Einen weiteren Hinweis bringt die Schwänzung der DEK der sensiblen rad2 und r^s_1 Stämme, die einen unterschiedlichen Defekt im EXC-System haben.

Der zunehmende relative Resistenzgewinn der Stämme mit zunehmender Dosis weist auf eine zunehmende Reparaturfähigkeit (ggf. durch Induktion) mehr als auf eine zunehmende Reparaturschädigung durch UV-Inaktivierung hin.

Wenn man einmal davon ausgeht, daß ein derartiges induzierbares Reparatursystem bei Hefen wirklich existiert, würde das von CALKINS (1973) entwickelte T-N-PR-Modell der Reparatur möglicherweise auch für Hefen gültig sein.
In diesem Modell wird versucht, durch Annahme eines konstitutiv arbeitenden Reparatur-Systems, "N" (analog dem Excision Repair System) und eines induzierbaren Systems "T" (analog dem Recombination Repair System) und der Photoreaktivierung "PR", die Reparatur der Zelle als höchst dynamisches und komplexes System anzusehen, das die Zelle in möglichst optimaler Weise gegen äußere und innere schädigende Einflüsse schützt. Es ist einsichtig, daß durch die Evolution mehrere Reparatursysteme mit verteilten Aufgaben, ggf. unterschiedlicher Schadensspezifität entwickelt wurden, die jedes getrennt für sich und in Kooperation arbeiten können. Dabei ist unbekannt, wie die Regelung dieses Zusammenspiels erfolgt. Ebenso ökonomisch erscheint es, daß mindestens ein System induzierbar ist und nur bei Bedarf gebildet wird.

Auch in dem Mutationsmechanismus, wie er diskutiert wurde, scheint ein evolutives Prinzip erkennbar zu sein:
Ein Mutationsereignis ist für die evolutive Entwicklung der Organismen äußerst wichtig, jedoch sollte dabei die Gefahr der Letalität möglichst gering gehalten werden. So erscheint es sinnvoll, wenn ein konstituv arbeitendes System zunächst eine Vielzahl von Schäden "unschädlich" macht durch exakte Reparatur und ein zweites System durch genetisch fixierte und ggf. sogar gerichtete Fehlerhaftigkeit eine mutative Änderung verursacht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die spontanen und UV-induzierten Mutationsraten zur Prototrophie und die UV-induzierte Mutationsrate zur Atmungsdefizienz bei strahlensensiblen Mutanten mit dem rad2, r_1^s und r_2^s Gen und dem strahlenresistenten Wildtyp untersucht.

Das Mutationsverhalten der Stämme sollte Hinweise dafür liefern

- ob die Strahlensensibilität durch die Veränderung eines an der DNS arbeitenden Reparaturenzyms verursacht wird,
- welchem Reparatursystem die Strahlensensibilität verursachenden Gene zuzuordnen sind,
- welche Reparatursysteme an der UV-induzierten Mutagenese beteiligt sein könnten.

Es wurde die Mutationsrate von der Auxotrophie zur Prototrophie an den supersupprimierbaren ochre-Allelen ade2-1 und lys2-1 bestimmt, da bei diesem System spezifisch die UV-Wirkung an den ochre-Codonen bzw. an den Loci, die die ochre-Suppressoren codieren, untersucht werden kann.

Der hochsensible rad2-19 bzw. rad2-20 Stamm (DRF 14, 6 bzw. 25, 6 bei 1% Überlebenden) zeigt, bei gleicher Dosis verglichen, eine 10^2 bis 10^3fach höhere Mutationsrate als der Wildtyp. Dabei ist der Anteil der Suppressormutanten an der Gesamtzahl der ADENIN- bzw. LYSIN-Revertanten wesentlich höher als beim Wildtyp (rad2-20 Mutante: 30 bis 50%, Wildtyp: 5% der Gesamtzahl der Revertanten). Verschiedene Hypothesen zur Erklärung dieses Unterschiedes werden diskutiert.

Der mittelsensible r_1^s bzw. r_2^s Stamm ($DRF_{1\%ü}$ 3, 14 bzw. 2, 70) zeigen bei gleicher Dosis die gleiche Häufigkeit der Locus- bzw.

Suppressormutationen wie der Wildtyp.

Die spontane Reversionsrate von der Adenin-Auxotrophie zur Prototrophie wurde mit Hilfe des Fluktuationstestes ermittelt. Ein erhöhender Einfluß aller drei Strahlensensibilität erzeugenden Gene konnte festgestellt werden.

Die UV-induzierte Mutationsrate zur Atmungsdefizienz wird ebenfalls durch die Strahlensensibilität verursachenden Mutationen beeinflußt. Jedoch übt auch der Grad der Atmungsdefizienz einer Zellpopulation einen stammspezifisch unterschiedlich starken Einfluß auf das Reparaturvermögen und somit möglicherweise auf die spontane und UV-induzierte Mutation aus.

Aus dem vom Wildtyp abweichenden Mutationsverhalten der sensiblen Mutanten kann der Schluß gezogen werden, daß durch das jeweilige rad Gen ein Enzym verändert ist, durch das bei der Reparatur von DNS Informationsänderungen ausgelöst werden. Dadurch ist die Annahme berechtigt, daß die Strahlensensibilität der untersuchten Mutanten nicht auf eine cytoplasmatische Sensibilisierung, sondern auf eine genetisch bedingte reduzierte Reparierfähigkeit von DNS-Schäden bedingt ist.

Das Verhalten der rad2 Mutanten spricht für den Defekt einer Endonuklease des Excision Repair Systems und entspricht damit allen Ergebnissen bisheriger biochemischer und strahlenbiologischer Untersuchungen von anderen rad2 Mutanten.

Abweichend von früheren Hypothesen wird aufgrund der Sensibilität der r^s_1 rad2-20 und r^s_2rad2-20 Doppelmutante eine Einordnung des R^s_1 und R^s_2 Gens in das Excision Repair System vorgeschlagen.

Mit der Arbeitshypothese, daß bei der r_1^s und r_2^s Mutante ein auf die Endonuklease folgendes Enzym, eine Polymerase oder Ligase, mutiert sein könnte, lassen sich verschiedene Eigenschaften der Mutanten erklären : gleichzeitige UV- und Röntgensensibilität, Sensibilität gegen verschiedene chemische Agenzien, spontanes und UV-induziertes Mutationsverhalten.

Für einen endgültigen Beweis bedarf es noch biochemischer Untersuchungen. Es sind jedoch eine Reihe von Analogien zu biochemisch analysierten Polymerase- und Ligase-defekten Mutanten von Bakterien und Hefen zu finden, die die Hypothese stützen.

Das Mutationsverhalten aller untersuchten Stämme läßt sich durch das für Bakterien und Hefen erstellte Modell erklären, daß das Excision Repair System weitgehend fehlerfrei arbeitet und daß die mutagenen Veränderungen der DNS durch ein weiteres Reparatursystem (REV-System?) entstehen. Das REV-System arbeitet an den von dem Excision Repair System nicht beseitigten primären UV-Schäden und verursacht dabei mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit Informationsänderungen an der DNS.

Durch das Mutationsverhalten der r_1^s und r_2^s Mutante wird bestätigt, daß bei Hefen für Mutationsvorgänge während der Mitose keine Rekombinationsereignisse nötig sind.

Die doppeltlogarithmische Auftragung der Mutationsrate über der wirksamen Dosis ermöglicht Aussagen über den Grad der Funktion dieser Abhängigkeit. Für den Wildtyp und die mittelsensiblen Mutanten ergibt sich eine (annähernd) quadratische Funktion, bei dem rad2-20 Stamm geht in sehr niedrigem Dosisbereich (10 bis 20 erg mm^{-2}) eine lineare Funktion in eine quadratische über.

Es werden verschiedene Hypothesen diskutiert, die diese Ergebnisse erklären könnten. Das Modell der durch die UV-Strahlung be-

wirkten Induktion eines fehlerhaft arbeitenden Reparatursystems erscheint besonders geeignet, das Mutationsverhalten der untersuchten Stämme zu erklären.
Es bleibt ungeklärt, ob das induzierte, fehlerhaft arbeitende Reparatursystem mit dem REV-System gleichzusetzen ist.

LITERATURVERZEICHNIS

Allen, E.R., I. Albrecht, J. W. Drake (1970) — Properties of bacteriophage T4 mutants defective in DNA polymerase. Genetics 65, 187-200

Auerbach, C., D. Ramsay (1970) — Analysis of a case of mutagen specifity in Neurospora crassa. II. Interaction between treatments with Diepoxybutane (DEB) and UV-light. Molec. Gen. Genet. 109, 1-17

Auerbach, C., D. Ramsay (1970) — Analysis of a case of mutagen specifity in Neurospora crassa. III. Fractionated treatment with Diepoxybutane. Molec. Gen. Genet. 109, 285-291

Auerbach, C., D. Ramsay (1971) — The problem of viability estimates in tests for reverse mutations. Mutation Res. 11, 353-360

Auerbach, C., B.J. Kilbey (1971) — Mutation in Eukaryotes. Ann. Rev. Gen. 5, 163-218

Averbeck, D. (1970) — Isolierung und Charakterisierung von drei UV-sensiblen Saccharomyces-Mutanten. Dissertation, Freie Universität Berlin

Averbeck, D., W. Laskowski, F. Eckardt, E. Lehmann-Brauns (1970) — Four radiation-sensitive mutants of Saccharomyces. Molec. Gen. Genet. 107, 117-127

Averbeck, D., M. Ebert (1972) — Genetic control of sensitization by oxygen involving repair systems in Saccharomyces. Int. J. Radiat. Biol. 21, 493-502

Averbeck, D., M. Ebert (1973) — Diploidy and repair of radiation damage in Saccharomyces mutants. Mutation Res. 19, 305-312

Baker, N.V., J. Thacker (1973) — Tests for direct or indirect mutagenic effects of ultrasound. Mutation Res. 21, 22

Bandas, E.L., M.L. Bekker, L.A. Luchina, V.P. Tkatchenko, I.A. Zakharov (1973) — Temperature sensitive mutants of the yeast Saccharomyces paradoxus. Molec. Gen. Genet. 126, 153-164

Beers, R.F, R.M. Herriott, R.C. Tilghman (eds, 1972) — Molecular and cellular repair processes. 5th. International Symposium on Molecular Biology The John Hopkins Medical Journal, Suppl. 1

Bockrath, R., M.K. Cheung (1973) — The role of nutrient broth supplementation in UV mutagenesis of E. coli. Mutation Res. 19, 23-32

Boyce, R.P., P.Howard-Flanders (1964) — Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in E.coli K12. Proc.Nat.Acad.Sci. 51, 293-300

Boyle, J.M., M.C. Patterson, R.B. Setlow (1970) — Excision repair properties of an E.coli mutant deficient in DNA polymerase. Nature 226, 708-710

Boyle, J.M. (1972) — Genetic and phsiological factors relating to excision repair in Escherichia coli. in: Molecular and Cellular Repair Processes, R.F. Beers, R.M.Herriott, R.C.Tilghman (eds), John Hopkins University Press, pp. 14-33

Bresch, C., R. Hausmann (1972) — Klassische und Molekulare Genetik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Bridges, B.A. (1966) — A note on the mechanism of UV-mutagenesis in E. coli. Mutation Res. 3, 273-279

Bridges, B.A. (1969) — Mechanims of radiation mutagenesis in cellular and subcellular systems. Ann.Rev.Nucl.Sci. 19, 139-178

Bridges, B.A., R.E. Dennis, R.J.Munson (1967a) — Mutation in Escherichia coli B/r WP2 try$^-$ by reversion or suppression of a chain terminating codon. Mutation Res. 4, 502-504

Bridges, B.A., R.E. Dennis, R.J.Munson (1967b) — Differential induction and repair of ultraviolet damage leading to true reversions and external suppressor mutations of an ochre codon in Escherichia coli B/r WP2. Genetics 57, 897-908

Bridges, B.A., R.J.Munson (1968) — Mutagenesis in E. coli: Evidence for the mechanism of basechange mutation by UV in a strain deficient in excision repair. Proc.Roy.Soc.B. 171, 213-226

Bridges, B.A., J.Law, R.J.Munson (1968) — Mutagenesis in E.coli: II. Evidence for a common pathway for mutagenesis by UV-light, ionizing radiation and thymine deprivation. Molec.Gen.Genet. 103, 266-273

Brown, A.M., B.J. Kilbey (1970) — Hyper-UV-sensitive Yeast: I. Isolation and properties of two such mutants. Molec.Gen.Genet. 108, 258-265

Brunk, C.F. (1973) Distribution of dimers in ultraviolet irradiated DNA Nature NB 241, 74-76

Brutlag, D., A. Kornberg (1972) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXVI. A proofreading function for the 3'-5'exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. J.Biol.Chem. 247, 241-248

Calkins, J. (1967a) Similarities in the radiation response of Escherichia coli and Tetrahymena pyriformis. Int.J.Radiat.Biol. 13, 283-288

Calkins, J. (1967b) An unusual form of response in X-irradiated protozoa and a hypothesis as to origin. Int.J.Radiat.Biol. 12, 297-301

Calkins, J. (1973) The T-N-PR model of radiation response. J.Theor.Biol. 39, 609-622

Cheung, M.K., Bockrath, R. (1970) On the specifity of UV mutagenesis of E. coli. Mutation Res. 10, 521-523

Cooper, P.K., P.C.Hanawalt (1972a) Heterogenity of patch size in repair replicated DNA in Escherichia coli. J.Mol.Biol. 67, 1-10

Cooper, P.K., P.C. Hanawalt (1972b) Role of DNA polymerase I and the rec system in excision repair in Escherichia coli. Proc.Nat.Acad.Sci. 69, 1156-1160

Coukell, M.B., C. Yanowski (1970) Increased frequency of deletion in DNA polymerase mutants of Escherichia coli. Nature 228, 633-635

Cox, B.S., J.M. Parry (1968) The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet-light sensitive mutants in yeast. Mutation Res. 6, 37-55

Dean, C., C. Pauling (1970) Properties of a deoxyribonucleic acid ligase mutant of Escherichia coli: X-ray sensitivity. J. Bacteriol. 102, 588-589

Defais, M., P.Fauquet, M. Radman, M. Errera (1971) Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of λ in different genetic systems. Virology 43, 495-503

De Lucia, P., J.Cairns (1969) Isolation of an E.coli strain with a mutation affecting DNA polymerase. Nature 224, 1164-1166

De Serres, F.J. (1971) Mutability of UV-sensitive strains of Neurospora crassa. Genetics 68, 14-15 (abstract)

Donch, J., M.H.L. Green, J. Greenberg (1968) — Interaction of the exr and lon genes in E. coli. J. Bacteriol. 96, 1704-1710

Doudney, C.O., C.S. Young (1962) — Ultraviolet light induced mutation and deoxyribonucleic acid replication in bacteria. Genetics 47, 1125-1138

Drake, J.W. (1969a) — Comperative rates of spontaneous mutation. Nature 221, 1132

Drake, J.W. (1969b) — Mutagenesis mechanisms. Ann. Rev. Genetics 3, 247-268

Drake, J.W. (1973) — The genetic control of spontaneous and induced mutation rates in bacteriophage T4. Genetics Suppl. 73, 45-64

Drake, J.W., E.R. Allen (1968) — Antimutagenic DNA polymerase in bacteriophage T4. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 339-344

Eckardt, F. (1970) — UV-induzierte Mutationsraten bei strahlensensiblen und -resistenten Hefestämmen. Staatsexamensarbeit, Wissenschaftliches Landesprüfungsamt Berlin

Emeis, C.C., H. Gutz (1958) — Eine einfache Technik zur Massenisolation von Hefesporen. Z. Naturforschg. 13b, 647-650

Ephrussi, B. (1953) — Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms. Clarendon Press, Oxford, England

Fabre, F. — A UV-supersensitive mutant in the yeast Schizosaccharomyces pombe: Evidence for two repair pathways. Molec. Gen. Genet. 110, 134-143

Fahr, E. (1969) — Chemische Untersuchungen über die molekularen Ursachen biologischer Strahlenschäden. Angew. Chem. 16, 581-597

Fauquet, P., Defais, M. (1972) — UV reactivation of phage λ in a polA mutant of E. coli. Mutation Res. 15, 353-355

x) Game, J., B.S. Cox (1971) — Allelism tests of mutants affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature. Mutation Res. 12, 328-331

Game, J., B.S. Cox (1972) — Epistatic interactions between four rad loci in yeast. Mutation Res. 16, 353-362

Game, J., B.S. Cox (1973) — Synergistic interactions between rad mutations in yeast. Mutation Res. 20, 35-44

Garen, A. (1968) — Sense and nonsense in the genetic code. Science 160, 149-159

x) siehe Anhang

Gorini, L. (1970) — informational suppression
Ann.Rev. Genetics 5, 107-134

Goulian, M., Z.J. Lucas, A. Kornberg (1968) — Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXV. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase induced by infection with $T4^+$.
J.Biol.Chem. 243, 626-638

Gross, J.D., M. Gross (1969) — Genetic analysis of an E.coli strain with a mutation affecting DNA polymerase.
Nature 224, 1166-1169

Gross, J.D., J.Grunstein, E.M. Witkin (1971) — Inviability of rec A^- derivatives of the DNA polymerase mutant of de Lucia and Cairns.
J.Mol.Biol. 58, 631-634

Grossman, L., E. Rodgers (1968) — Evidence for the presence of cytosine photohydrates in UV irradiated nucleic acids.
Biochem.Biophys.Res. Commun. 33, 975-983

Guéron, M., R.G. Shulman (1968) — Energy transfer in polynucleotides.
Ann.Rev. Biochem. 37, 571-596

Haefner, K. (1961) — Zur Analyse der strahleninduzierten Inaktivierung und Mutabilität von Saccharomyces-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades.
Diplomarbeit, Freie Universität Berlin

Haefner, K. (1965) — Untersuchung der Induktion prototropher Mutanten durch ultraviolettes Licht bei Saccharomyces in Abhängigkeit von Dosis und Nachbehandlung.
Dissertation, Freie Universität Berlin

Haefner, K., W. Laskowski (1963) — Zur Induktion prototropher Saccharomyces-Mutanten durch ultraviolettes Licht in Abhängigkeit von Dosis und Nachbehandlung.
Z.Naturforschg. 18b, 301-309

Hall, R.M. (1973) — Increased spontaneous mutation rates in mutants of E. coli with altered DNA polymerase III.
Molec.Gen.Genet. 121, 271-276

Harm, W., C.S.Rupert, H.Harm (1971) — The study of photenzymatic repair of UV lesions in DNA by flash photolysis.
in: Photophysiology VI, pp.279-324, ed. A.C.Giese Academic Press, New York, London

Hawthorne, D.C. (1969a) — The selection of nonsense suppressors in yeast.
Mutation Res. 7, 187-197

Hawthorne, D.C. (1969b) — Identification of nonsense codons in yeast.
J.Mol.Biol. 43, 71-75

Hawthorne, D.C., Friis, J. (1964) — Osmotic remedial mutants: A new classification for nutritional mutants in yeast.
Genetics 50, 829-839

Hawthorne, D.C., R.K. Mortimer (1963) — Supersuppressors in yeast.
Genetics 48, 617-620

Hawthorne, D.C., R.K. Mortimer (1968) — Genetic mapping of nonsense suppressors in yeast. Genetics 60, 735-742

Haynes, R.H. (1964) — Role of DNA repair mechanisms in microbial inactivation and recovery phenomena. Photochem. Photobiol. 3, 429-450

Haynes, R.H. (1966) — The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena, Radiat. Res. Suppl. 6, 1-29

Haynes, R.H., R.M. Baker, G.E. Jones (1968) — Genetic implications of DNA repair. in: Energetics and Mechanisms in Radiation Biology, pp. 425-465, G.O. Philips, ed. Academic Press, New York, London

Hershfield, M.S., N.G. Nossal (1973) — In vitro characterization of a mutant T4 DNA polymerase. Genetics Suppl. 73, 131-136

Hill, R. (1965) — Ultraviolet induced lethality and reversion to prototrophy in Escherichia coli strains with normal and reduced dark repair ability. Photochem. Photobiol. 4, 563-568

Holliday, R. (1971) — Biochemical measure of the time and frequency of radiation induced allelic recombination in Ustilago. Nature NB 232, 233-236

Howard-Flanders, P., R.P. Boyce (1966) — DNA repair and genetic recombination: studies on mutants of E. coli defective in these processes. Radiat. Res. Suppl. 6, 156-184.

Howard-Flanders, P. (1968a) — DNA repair. Ann. Rev. Biochem. 37, 175-200

Howard-Flanders, P. (1968b) — Genes that control DNA repair and genetic recombination in E. coli. Adv. Biol. Med. Phys. 12, 299-317.

Hunnable, E.G., B.S. Cox (1971) — The genetic control of dark recombination in yeast. Mutation Res. 13, 297-309

Ishii, Y., S. Kondo (1972) — Spontaneous and radiation-induced deletion mutations in Escherichia coli strains different in DNA repair capacities. Mutation Res. 16, 13-25

Jannsen, S., W. Laskowski (1967) — Die Wirkung von Ultraschall auf die O_2-Aufnahme und die anaerobe CO_2-Abgabe von Hefezellen. Biophysik 4, 97-100

Kanner, L., P.C. Hanawalt (1970) — Repair deficiency in a bacterial mutant defective in DNA polymerase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 149-155

Kelly, R.B., M.R. Atkinson, J.A. Huberman, A. Kornberg (1969)
Excision of thymine dimers and other mismatched sequences by DNA polymerase of E. coli. Nature 224, 495-501

Kellerer, A.H., O.Hug (1972)
Theory of dose-effect-relations. in: Handbuch der Medizinischen Radiologie, pp. 1-42, Bd. II, Strahlenbiologie

Khan, N.A., M.Brendel, R,H.Haynes (1970)
Supersensitive double mutants in yeast. Molec. Gen. Genet. 107, 376-378

Kiefer, J. (1969)
ß-ray split-dose recovery in diploid yeast in hypoxic conditions. Nature 223, 405-406

Kiefer, J. (1971)
The importance of cellular energy metabolism for the sparing effect dose fractionating with electrons and ultraviolet light. Int.J.Radiat.Biol. 20, 325-336

Kilbey, B.J. (1973a)
The stabilization of a transient mutagen sensitive state in Neurospora by the protein synthesis inhibitor Actidione. Molec. Gen. Genet. 123, 67-72

Kilbey, B.J. (1973b)
The manipulation of mutation-induction kinetics in Neurospora crassa. Molec. Gen. Genet. 123, 73-76

Kondo, S. (1972)
A theoretical study on spontaneous mutation rate. Mutation Res. 14, 365-374

Kondo, S. (1973)
Evidence that mutations are induced by errors in repair and replication. Genetics Suppl. 73, 109-122

Kondo, S., H.Ichikawa, K.Iwo, T. Kato (1970)
Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of Escherichia coli with different DNA repair capacities. Genetics 66, 187-217

Kössler, F. (1970)
Ursachen der verschiedenen Strahlenempfindlichkeit und modifizierende Faktoren. Biol. Rundschau 8, 331-345

Kowalski, S. (1971)
Herstellung und Charakterisierung von auxotroph-strahlensensiblen Saccharomyces-Stämmen. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin

Kraepelin, G. (1967)
Der Atmungsdefekt bei Hefezellen: eine kritische Betrachtung seiner Ursachen. I. Induktion und Reversibilität der "petite" Mutation. Z.Allg.Mikrobiol. 7, 287-325

Laskowski, W., D.Averbeck (1968)
UV- und X-ray-sensitive mutants of Saccharomyces. studia biophysica 12, 167-172

Laskowski, W., E. Lehmann-Brauns (1973) Cross sensitivity to mono- and bifunctional alkylating agents of three radiation-sensitive Saccharomyces mutants. Biophysik 10, 51-59

Laskowski, W., E.R. Lochmann, S. Jannsen, E. Fink (1968) Zur Isolierung einer strahlensensiblen Saccharomyces-Mutante, Empfindlichkeit des Koloniebildungsvermögens, der RNS- und Proteinsynthese. Biophysik 4, 233-242

Lawrence, C.W., J.W. Stewart, F. Sherman, F.L.X. Thomas (1970) Mutagenesis in ultraviolet-sensitive mutants of yeast. Genetics 64, 36

Lea, D.W. C.A. Coulson (1949) Distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. J. Genet. 49, 264-285

Lederberg, J., E. Lederberg (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63, 399-406

Lemontt, J.F. (1970) Genetic control of mutation induction in Saccharomyces cerevisiae. Ph.D. Thesis, Lawrence Radiation Laboratory, University of California

Lemontt, J.F. (1971a) Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light. Genetics 68, 21-33

Lemontt, J.F. (1971b) Pathways of ultraviolet mutability in Saccharomyces cerevisiae. I. Some properties of double mutants involving uvs9 and rev. Mutation Res. 13, 311-317

Lemontt, J.F. (1971c) Pathways of ultraviolet mutability in Saccharomyces cerevisiae. II. The effect of rev genes on recombination. Mutation Res. 13, 319-326

Lemontt, J.F. (1972) Induction of forward mutations in mutationally defective yeast. Molec. Gen. Genet. 119, 27-42

Lemontt, J.F. (1973) Genes controlling ultraviolet mutability in yeast. Genetics Suppl. 73, 153-159

Lochmann, E.R., C. Umlauf (1971) Über den Einfluß der Zellkonzentration auf die Dunkelreaktivierung von Saccharomyces-Zellen nach UV-Bestrahlung. studia biophysica 27, 85-90

Loprieno, N. (1972) On the possible involvement of repair on the process of mutations in Schizosaccharomyces pombe. Radiat. Res. 51, 497-498

Luria, S.W., M. Delbrück (1943) — Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 28, 491-511

Magni, G.E., P.P. Puglisi (1966) — Mutagenesis of super-suppressors in yeast. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 31, 699-704

Magni, G.E., S.Sora (1969) — Relationship between recombination and mutation. in: Mutation as Cellular Process, pp. 186-195, Ciba Symposium, G.E.W. Wolstenholme and M.oConnor, eds., London

Magni, G.E., R.C.v. Borstel (1962) — Different rates of spontaneous mutations during mitosis and meiosis in yeast. Genetics 47, 1097-1108

Magni, G.E., R.C.v.Borstel, C.M.Steinberg (1966) — Super-suppressors as addition-deletion mutants, J.Mol.Biol. 66, 568-570

Maroudas, N.G., D. Wilkie (1968) — Ultraviolet irradiation studies on the cytoplasmic determinant of the yeast mitochondrium. Biochim.Biophys.Acta 166, 681-688

Masker, W.E., P.C. Hanawalt (1973) — Ultraviolet-stimulated DNA synthesis in toluenized Escherichia coli deficient polymerase I. Proc,Nat.Acad.Sci. 70, 129-133

Masker, W.E., P.C. Hanawalt, H. Shizuya (1973) — Role of DNA polymerase II in repair replication in Escherichia coli. Nature NB 244, 242-243

McClary, D.O., W.L. Nulthy, G.R. Miller (1959) — Effect of potassium versus sodium in the sporulation of Saccharomyces. J.Bacteriol. 78, 362-368

Meistrich, M.L., J.W. Drake (1972) — Mutagenic effects of thymine dimers in bacteriophage T4. J.Mol.Biol. 66, 107-114

Mennigmann, H.D.(1972) — Pyrimidine dimers as pre-mutational lesions in Escherichia coli WP2 hcr$^-$ Molec.Gen.Genet. 117, 167-186

Meyn, R., B. Friesen, J. Baptist (1969) — Host cell reactivation of gamma-irradiated phage T1 in strains of Escherichia coli K12. Molec.Gen.Genet. 104, 66-72

Miura, A., J.J. Tomizawa (1968) — Studies on radiation sensitive mutants of E.coli. III. Participation of the rec system in induction of mutation by ultraviolet irradiation. Molec.Gen.Genet. 103, 1-10

Monk, M., M.Peacey, J.D. Gross (1971) — Repair of damage induced by ultraviolet light in DNA polymerase-defective Escherichia coli cells. J.Mol.Biol. 58, 623-630

Mortimer, R.K., R.A. Gilmore (1968) — Suppressors and suppressible mutants in yeast. Adv.Biol.Med.Phys. 12, 319-331

Mounolou, J.C., H. Jacob, P.P. Slonimski (1966) Mitochondrial DNA from yeast "petite" mutants: specific changes of buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 218-224

Moustacchi, E. (1969) Cytoplasmic and nuclear genetic events induced by UV-light in strains of Saccharomyces cerevisiae with different UV-sensitivities. Mutation Res. 7, 171-185

Moustacchi, E. (1971) Evidence for nucleus independent steps in control of repair of mitochondrial damage. I. UV-induction of the cytoplasmic "petite" mutation in UV-sensitive nuclear mutants of Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genet. 114, 50-58

Moustacchi, E. (1973) Cytoplasmic "petite" induction in recombination deficient mutants of Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 115, 805-809

Moustacchi, E., S. Enteric (1970) Differential "liquid holding recovery" for the lethal effect and cytoplasmic "petite" induction by UV-light in Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genet. 109, 69-83

Nagley, P., A. W. Linnane (1970) Mitochondrial DNA deficient petite mutants of Yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 989-996

Nishioka, H., C.O. Doudney (1969a) Different modes of loss of photoreversibility of mutation and lethal damage in ultraviolet light resistant and sensitive bacteria. Mutation Res. 8, 215-228

Nishioka, H., C.O. Doudney (1969b) Different modes of loss of photoreversibility of UV induced true and suppressor mutations to tryptophan independence in an auxotrophic strain of E. coli. Mutation Res. 9, 349-358

Nossal, N.G., M.S. Hershfield (1971) Nuclease activity in a fragment of bacteriophage T4 deoxyribonucleic acid polymerase induced by the amber mutant am B22. J. Biol. Chem. 246, 5414-5426

Okazaki, R. M. Arisawa, S. Sugino (1971) Slow joining of newly replicated DNA chains in DNA polymerase I deficient Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2954-2957

Ono, J., R.G. Wilson, L. Grossman (1965) Effects of ultraviolet light on the template properties of polycytidylic acid. J. Mol. Biol. 11, 600-612

Parry, E.M., J.M. Parry (1973) Genetic analysis of UV-inactivation, recovery and regulatory phenomena in a strain of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genet. 117-133

Parry, E.M., J.M. Parry, R. Waters (1972) — Genetic and physiological analysis of UV-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae. Mutation Res. 15, 135-146

Parry, J.M. (1972) — A quantitative analysis of "negative liquid - holding" in some UV-sensitive strains of yeast. Molec. Gen. Genet. 118, 33-43

Parry, J.M., B.S. Cox (1968) — The effects of dark holding and photoreactivation on ultraviolet light-induced mitotic recombination and survival in yeast. Genet. Res., Camb. 12, 187-198

Parry, J.M., E.M. Parry(1969) — The effects of UV-light posttreatments on the survival characteristics of 21 UV-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae. Mutation Res. 8, 545-556

Parry, J.M., E.M. Parry (1972) — The genetic implication of UV-light exposure and liquid holding posttreatment in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Genet. Res., Camb. 19, 1-16

Paterson, M.C., J.M. Boyle, R.B. Setlow (1971) — Ultraviolet and X-ray induced responses of a deoxyribonucleic acid polymerase-deficient mutant of Escherichia coli. J. Bacteriol. 107, 61-67

Patrick, M.H. (1972) — Nature of repairable damage in DNA. Annual Report of the Division of Biology, University of Texas at Dallas

Pauling, C., L. Hamm (1968) — Properties of a temperature-sensitive radiation-sensitive mutant of Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 1495-1502

Pauling, C., L. Hamm (1969) — Properties of a temperature-sensitive radiation-sensitive mutant of Escherichia coli. II. DNA replication. Proc. Nat. Acad. Sci. 64, 1195-1202

Pittman, D., D.R. Pedigo (1959a) — Reactivation studies on yeast. I. Ultraviolet inactivation and photoreactivation of respiratory-sufficient and respiratory-deficient yeasts. Exp. Cell Res. 17, 359-367

Pittman, D., B. Banganathan, F. Wilson (1959b) — Photoreactivation studies on yeasts. II. Photoreactivation of the ultraviolet damage producing respiratory deficiency in haploid and tetraploid yeasts. Exp. Cell Res. 17, 368-377

Radman, M., L. Cordone, D. Krsmanovic-Simic, M. Errera (1970) — Complementary action of recombination and excision in the repair of ultraviolet irradiation damage to DNA. J. Mol. Biol. 49, 203-212

Raut, C., W.L. Simpson (1955) — The effect of X-rays and of ultraviolet light for different wavelenghts on the production of cytochrome deficient yeasts. Arch. Biochem. 57, 218

Reichert, U. (1968) — Gendosiswirkungen in einem tri- und tetraploiden ad2-Mutantensystem von Saccharomyces und deren molekularbiologische Bedeutung. Dissertation, Freie Univers ität Berlin

Resnick, M.A. (1968) — Genetic control of lethality and mutation in Saccharomyces cerevisiae. Ph.D. Thesis, Berkeley, California

Resnick, M.A., J.K. Setlow (1972) — Repair of pyrimidine dimer damage induced in yeast by ultraviolet light. J. Bacteriol. 109, 979-986

Rodarte-Ramon, U. (1972) — Radiation-induced recombination in Saccharomyces: The genetic control of recombination in mitosis and meiosis. Radiat. Res. 49, 148-154

Rodarte-Ramon, U., R.K. Mortimer (1972) — Radiation-induced recombination in Saccharomyces: Isolation and genetic studies of recombiantion-deficient mutants. Radiat. Res. 49, 133-147

Rossi, H.H., A.M. Kellerer (1972) — Radiation carcinogenesis at low doses. Science 175, 200-202

Rupert, C.S., W. Harm (1966) — Reactivation of photobiological damage. in: Advances in Radiation Biology, Vol II, pp. 1-81 Academic Press, New York

Schaarschmidt, B. (1970) — Eine einfache Methode zur Bestimmung des Quantenflusses von Bestrahlungslampen im Wellenlängenbereich 2400 Å - 6000 Å. Z. Naturforschg. 25b, 330-331

Schaarschmidt, B. (1972) — Mikrokalorimetrische Untersuchungen zum Betriebsstoffwechsel UV-strahlensensibler Hefe-Mutanten. Dissertation, Freie Universität Berlin

Schaarschmidt, B., C. Umlauf, I. Lamprecht (1973) — Energy metabolism and repair of UV damage in Saccharomyces. 1. The effect of glucose on recovery of UV-sensitive mutants. Int. J. Radiat. Biol. 24, 433-441

Schuster, H. (1969) — Die molekularen Grundlagen der Photoreaktivierung. in: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol47, pp. 40-68, Springer-Verlag, Berlin, Heidleberg, New York

Setlow, J.K. (1966a) — Photoreaktivation Radiat. Res. Suppl., 6, 141-155

Setlow, J.K. (1966b) — The molecular basis of biological effects of UV irradiation and photoreactivation. in: Current Topics of Radiation Research, Vol. II, North Holland Publishing Comp., Amsterdam

Setlow, R.B., W.L. Carrier (1964) — The disappearance of thymine dimers from DNA: An error-correcting mechanism. Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 226-231

Setlow, R.B., W.L. Carrier (1966) — Pyrimidine dimers in ultraviolet irradiated DNA's. J. Mol. Biol. 17, 237-254

Setlow, P., D. Brutlag, A. Kornberg (1972) — Deoxyribonucleic acid polymerase: two distinct enzymes in one polypeptide. J. Biol. Chem. 247, 224-231

Setlow, P., A. Kornberg (1972) — Deoxyribonucleic acid polymerase: two distinct enzymes in one polypeptide. J. Biol. Chem. 247, 232-240

Sherman, F., P.P. Slonimski (1964) — Respiratory deficient mutants in yeast. II. Biochemistry. Biochim. Biophys. Acta 90, 1-15

Sherman, F., J. W. Stewart, M. Cravens, F.L.X. Thomas, N. Shipman (1969) — Different action of UV on a nonsense codon located at two different positions in the iso-1-cytochrome of yeast. Genetics 61, 55

Smith, K.C. (1966) — Physical and chemical changes induced in nucleic acid by ultraviolet light. Radiat. Res. Suppl. 6, 54-79

Smith, K.C. (1971) — The role of genetic recombination and DNA polymerase in the repair of damaged DNA. in: Photophysiology VI, pp. 209-270, A.C. Giese ed., Academic Press, New York

Smith, K.C., P.C. Hanawalt (1969) — Molecular Photobiology Academic Press, New York, London

Snow, R. (1967) — Mutants of yeast sensitive to ultraviolet light. J. Bacteriol. 94, 571-575

Speyer, J.F. (1965) — Mutagenic DNA polymerase. Biochem. Biophys, Res. Commun. 21, 6-8

Stevens, W.L. (1942) — Accuracy of mutation rates. J. Genet. 43, 301-307

Stewart, J.W., F. Sherman (1972) — Demonstration of UAG as a nonsense codon in baker's yeast by aminoacid replacements in iso-1-cytochrome c. J. Mol. Biol. 68, 429-443

Stewart, J.W., F. Sherman, M. Jackson, F.L.X. Thomas N. Shipman (1972) — Demonstration of the UAA ochre codon in baker's yeast by aminoacid replacements in iso-1-cytochrome c. J. Mol. Biol. 68, 83-96

Swinton, D.C., P.C. Hanawalt (1973) — The fate of pyrimidine dimers in ultraviolet irradiated Chlamydomonas. Photochem. Photobiol. 17, 361-375

Thacker, J. (1973) — The possibility of genetic hazard from ultrasonic radiation. Current Topics in Rad. Res. Quarterly 8, 235-258

Town, C.D., K.C. Smith, H.S. Kaplan (1971) — DNA polymerase required for rapid repair of X-ray induced DNA strand breaks in vivo. Science 172, 851-854

Tyrell, R.M., S.H. Moss, D.J.G. Davies (1972) — The variation in the UV sensitivity of four k12 strains of Escherichia coli as a function of their stage of growth. Mutation Res. 16, 1-12

Unrau, P., R. Wheatcroft, B.S. Cox (1971) — The excision of pyrimidine dimers from DNA of ultraviolet-irradiated yeast. Molec. Gen. Genet. 113, 359-362

Varghese, A.J. (1972) — Photchemistry of nucleic acids and their constituents. in: Photophysiology VII, pp. 207-274, A.C. Giese ed., Academic Press, New York

v. Borstel, R.C. (1969) — On the origin of spontaneous mutations. Japan. J. Genetics 44, 102-105

v. Borstel, R.C., K.T. Cain, C.M. Steinberg (1971) — Inheritance of spontaneous mutability in yeast. Genetics 69, 17-27

v. Borstel, R.C., D.E. Graham, K.J. La Brot, M. Resnick (1968) — Mutator activity of a X-radiation sensitive yeast. Genetics 60, 233

v. Borstel, R.C., S.K. Quah, C.M. Steinberg, F. Flury, D.J.C. Gottlieb (1973) — Mutants of yeast with enhanced spontaneous mutation rates. Genetics Suppl. 73, 141-151

Wild, D. (1973) — Chemical induction of streptomycin-resistant mutations in Escherichia coli. Dose and mutagenic effects of Dichlorus and Methyl-methansulfonate. Mutation Res. 19, 33-41

Williamson, D.H. (1970) — Biological properties and genetic significance of mitochondrial DNA in cytoplasmic petite yeast mutants. Heredity 25, 491

Witkin, E.M. (1956) — Time, temperature and protein synthesis: a study of ultraviolet-induced mutation in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant, Biol. 21, 123-140

Witkin, E.M. (1966a) Mutation and the repair of radiation damage in bacteria. Radiat.Res.Suppl. 6, 30-53

Witkin, E.M. (1966b) Radiation-induced mutations and their repair. Science 152, 1345-1352

Witkin, E.M. (1967) Mutation-proof and mutation-prone modes of survival in derivatives of E. coli B differing in sensitivity to ultraviolet light. Brookhaven Symp.Biol. 20, 17-53

Witkin, E.M. (1969a) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. Ann.Rev.Genet. 3, 525-552

Witkin, E.M. (1969b) The mutability toward ultraviolet light of recombination deficient strains of E. coli. Mutation Res. 8, 9-14

Witkin, E.M. (1971) Ultraviolet mutagenesis in strains of E. coli deficient in DNA polymerase. Nature NB 229, 81-82

Witkin, E.M., D.L.George (1973) Ultraviolet mutagenesis in polA und uvrA polA derivatives of Escherichia coli B/r. Evidence for an inducible error-prone repair system. Genetics Suppl. 73, 91-108

Youngs, D.A., K.C.Smith (1973) Involvement of DNA polymerase III in excision repair after ultraviolet irradiation. Nature NB 244, 240-241

Zakharov, I.A., T.N. Kozina, I.V. Federova (1970) Effects des mutations vers la sensibilite´au rayonnement ultraviolet chez la levure. Mutation Res. 9, 31-39

Anhang

Fisher, C.R. (1969) Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of Saccharomyces and Schizosaccharomyces. Biochem.Biophys.Res.Commun. 34, 306-310

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit bauten auf meiner Examensarbeit für die Erste (Wissenschaftliche) Staatsprüfung für das Amt des Studienrats auf.
Sie wurden in der Zeit von August 1970 bis Mai 1973 in der Arbeitsgruppe Strahlenbiologie und Genetik des Zentralinstitutes für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Laskowski durchgeführt, dem ich für die Unterstützung und anregende Diskussionen sehr zu Dank verpflichtet bin.

Viele Mitglieder des Zentralinstitutes haben in irgendeiner Weise den Fortgang der Arbeit unterstützt; ihnen allen danke ich hiermit herzlich.

Für die Beratung in physikalischen und mathematischen Problemen danke ich Herrn Dr. I. Lamprecht und Herrn Dr. B. Schaarschmidt vielmals.

Mein besonderer Dank gilt Frau S. Kowalski, die mir noch nicht veröffentlichte Ergebnisse ihrer Arbeit für die Diskussion zur Verfügung stellte und die meine Arbeit durch ihre stete Hilfsbereitschaft und anregenden Diskussionen sehr gefördert hat.

Am 9.Juni 1944 wurde ich als Tochter des Chemikers Dr. Karl Eckardt und seiner Frau Elfriede, geb. Dietrich, in Chemnitz geboren.

Im September 1948 siedelten wir nach Wuppertal um. Dort besuchte ich ab Ostern 1950 die Volksschule und ab Ostern 1954 das Städtische Mädchengymnasium Wuppertal-Elberfeld, dessen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Zweig ich Ostern 1958 wählte. Im Februar 1963 machte ich Abitur.

Im Sommersemester 1963 wurde ich an der Justus-Liebig-Universität in Gießen für Biologie immatrikuliert. Im Sommersemester 1965 setzte ich an der Freien Universität Berlin mein Studium fort.

Im November 1966 bestand ich die Diplom-Vorprüfung in Biologie. Im Juni 1970 legte ich die Erste (Wissenschaftliche) Staatsprüfung für das Amt des Studienrats in des Fächern Biologie, Chemie und Physik ab. Die experimentellen Arbeiten für die Examensarbeit wurden unter Prof. Dr. W. Laskowski im Institut für Biophysik durchgeführt.

Von Mai 1968 bis Mai 1969 war ich wissenschaftliche Hilfs-Assistentin am Botanischen Institut der Freien Universität, von Juni 1969 bis Mai 1970 studentische Hilfskraft am Institut für Biophysik. Von Juni 1970 bis Januar 1971 war ich Teilzeit-Assistentin, seit Februar 1971 bin ich wissenschaftliche Assistentin am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin.